

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Gerd Sutter

Rekombinante Ektromelieviren zur Expression des Fluoreszenzmarkers mCherry

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Asisa Katharina Volz
aus Neunkirchen

München, 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Sutter

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. André

Tag der Promotion: 21.Juli 2012

Meiner lieben Familie in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Die Geschichte der Pockenviren.....	3
2.	Die Familie der Pockenviren	4
3.	Der Aufbau von Pockenviren	5
4.	Das Virusgenom	7
5.	Der Lebenszyklus der Pockenviren	8
6.	Virale Transkription und Morphogenese.....	9
7.	DNA-Replikation	11
8.	Pathogenese von Infektionen mit Pockenviren	12
9.	Ektromelievirus, der Erreger der Mäusepocken.....	14
10.	Pathogenese und Pathologie der Ektromelie-Infektion	14
11.	Biologie, Genetik und Empfänglichkeit.....	17
12.	Die Mäusepocken als Modell für die <i>Variola vera</i> des Menschen.....	19
13.	ECTV als Modell zur Untersuchung von Virus-Wirt-Interaktion...	20
14.	Das Mäusepockeninfektionsmodell in der pharmazeutischen Forschung.....	21
15.	Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen im Virusinfektionsmodell.....	23
16.	Das Grün-Fluoreszierende Protein GFP.....	25
17.	Rot-fluoreszierende Proteine	28
18.	Zielsetzung der Arbeit.....	31

III.	MATERIAL UND METHODEN	32
1.	Chemikalien	32
2.	Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	33
3.	Nährmedien und Zusätze.....	34
4.	Nicht markierte Antikörper	34
5.	Markierte Antikörper	34
6.	Bakterienstämme	35
7.	Primer.....	35
8.	Plasmide	36
9.	Viren	36
10.	Zellkultur	36
10.1.	Kultivierung permanenter Zellen	36
10.2.	Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen	37
10.2.1.	Milzzellen	37
10.2.2.	Myeloide Dendritische Zellen	37
10.2.3.	Differenzierung primärer Makrophagen.....	38
10.2.4.	Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen	38
10.3.	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	38
10.4.	Bestimmung der Zellzahl.....	39
10.5.	Infektion von Zellen	39
11.	Gewinnung von Virusmaterial.....	40
11.1.	Virusmaterial für Lagerung und in vitro Experimente	40
11.2.	Bestimmung der Infektiosität virushaltiger Suspensionen	40
11.3.	Herstellung rekombinanter Viren.....	41
11.4.	Transfektion virusinfizierter Zellen.....	41
11.5.	Klonale Isolierung rekombinanter Viren in der Zellkulturpassage.....	42
12.	Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit von Ektromelivirus	42
12.1.	Mehrschritt-Wachstumskurve	42
13.	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	43
13.1.	Kultivierung von kompetenten Bakterien.....	43
13.2.	Transformation kompetenter Bakterien	43

13.3.	Animpfen von Flüssigkulturen zur Minipräparation von Plasmid-DNA.....	44
13.4.	Animpfen von Flüssigkulturen zur Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	44
14.	DNA- Methoden	44
14.1.	Präparation von Plasmid DNA.....	44
14.2.	Präparation von Komplet-DNA aus virusinfizierten Zellen.....	45
14.3.	Präparation zytoplasmatischer DNA.....	45
14.4.	Phenol/Chloroform Extraktion	46
14.5.	Qualitätskontrolle isolierter DNA	46
14.6.	Restriktionsanalyse	47
14.7.	Trennung von DNA Fragmenten mit Agarose-Gel-Elektrophorese	47
14.8.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel	48
14.9.	Isolierung von DNA aus Restriktions- bzw. Ligationsansätzen.....	48
14.10.	Ligationsansatz	48
14.11.	Dephosphorylierung von DNA.....	49
14.12.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
14.13.	PCR zur Untersuchung viraler DNA	51
14.14.	Sequenzanalyse klonierter DNA	51
15.	Proteinbiochemische Methoden	52
15.1.	Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen.....	52
15.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	52
15.3.	Western Blot.....	52
15.4.	Herstellung von SDS-PAGE-Gelen (Größe 135x115x1,5mm)	52
15.4.1.	Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
15.4.2.	Membrantransfer	54
15.4.3.	Immunodetektion von Proteinen.....	55
15.4.4.	Durchflusszytometrie.....	56
IV.	ERGEBNISSE.....	57
1.	Konstruktion des mCherry-Expressionsvektor	57
1.1.	Identifizierung der Insertionsstelle im ECTV-Genom.....	57

1.2.	Klonierung von flankierenden ECTV-Gensequenzen und der mCherry-Expressionskassette	59
1.3.	Charakterisierung des mCherry-Expressionsplasmids in Restriktionsanalyse und transienter Expression.....	64
2.	Konstruktion rekombinanter ECTV zur Expression von mCherry	68
2.1.	Generierung rekombinanter Viren nach DNA-Transfektion und ECTV-Infektion	68
2.2.	Isolierung klonaler ECTV-mCherry durch Plaquespassagen	69
2.3.	Molekulare Charakterisierung der finalen ECTV-mCherry Isolate	74
3.	Charakterisierung der ECTV-mCherry im Infektions-Experiment in Zellkultur	74
3.1.	Rekombinante Genexpression in MA-104-Zellen	74
3.2.	Wachstumsanalyse in MA-104-Zellen	79
3.3.	Wachstumsanalyse und rekombinante Genexpression in etablierten Zelllinien der Maus	81
3.4.	Wachstumsanalyse und rekombinante Genexpression in primären Milz- und Knochenmarkszellen der Maus.....	88
V.	DISKUSSION.....	95
1.	Identifizierung eines geeigneten Insertionslokus im ECTV Genom	95
2.	Herstellung und klonale Isolierung rekombinanter Ektromelieviren zur Expression von Markergenen	99
3.	Vergleichende Charakterisierung der Vektorviren hinsichtlich mCherry Synthese nach in vitro Infektion	104
4.	Vergleichende Charakterisierung der Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren nach in-vitro-Infektion	107
5.	Schlussfolgerung	114
6.	Ausblick	115
6.1.	In vivo Infektion	115

VI.	ZUSAMMENFASSUNG	117
VII.	SUMMARY	119
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	121
IX.	ANHANG	125
1.	Geräte	125
2.	Kommerziell erhältliche Reagentien, Kits und Standards	126
3.	Sequenzvergleich der Vacciniavirus MVA Gene mit den Ektromelievirus Stamm Moskau Genen	127
3.1.	Vacciniavirus MVA ORF I8R mit dem Homolog EVM063 des Ektromelievirus Stamm Moskau	127
3.2.	Vacciniavirus MVA ORF G1L mit dem Homolog EVM064 des Ektromelievirus Stamm Moskau	130
4.	Vergleich der Aminosäurenabfolge der Vaccinia MVA Proteine mit den Homologen des Ektromelievirus Stamm Moskau	131
4.1.	Aminosäurevergleich des Vacciniavirus MVA Protein I8R mit dem Ektromelie Stamm Moskau Protein EVM063	131
4.2.	Aminosäurevergleich des Vacciniavirus MVA Protein G1L mit dem Ektromelievirus Stamm Moskau Protein EVM064	132
X.	DANKSAGUNG	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serum Albumin
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cpE	zytopathischer Effekt
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ECTV	Ektromelievirus
EGF	Epidermal Growth Factor
EVM	Ektromelievirus Stamm Moskau
FACS	fluorescence activated cell sorting
H	Hour = Stunde
IEV	intracellular enveloped virion
ITR	Inverted terminal repeats
IMV	intracellular mature virion
IV	intracellular virion
kDa	Kilodalton
Min	Minuten
ml	Milliliter
MOI	Multiplicity of infection
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
Nm	Nanometer
ORF	Open reading frame
OPV	Orthopockenviren
RT	Raumtemperatur
PFU	Plaque forming unit
POD	Peroxidase
PCR	Polymerase Chain reaction
RMP	Resistance to Mousepox
S	Sekunden
v/v	volume to volume
WHO	World Health Organization

I. EINLEITUNG

Die Pockenviren beinhalten verschiedenste Viren, die sowohl Insekten als auch Wirbeltiere infizieren können. Besonders bekannt ist das Genus der Orthopockenviren mit „berühmten“ Viren wie dem Variolavirus oder dem Vacciniavirus, als Prototyp aller Impfviren. Das Variolavirus ist der Erreger der gefährlichen Menschenpockenerkrankung, die einst, neben anderen wichtigen Epidemien, wie Pest, Tuberkulose und Cholera, zu den am meisten gefürchteten Infektionskrankheiten der Menschheit gehörte. Alleine im 19. Jahrhundert forderte die Variolavirusinfektion 300 Millionen Todesopfer und somit mehr Menschenleben als alle anderen Epidemien zusammen. Die Entdeckung, dass eine Impfung mit dem sehr nahe verwandten Vacciniavirus zuverlässigen Schutz vor dieser verlustreichen Krankheit bot, war daher von außerordentlicher Wichtigkeit für eine erfolgreiche Bekämpfung dieser Seuche.

Tatsächlich gelang es im Jahre 1980 nach Jahrzehnte langer Impfkampagne und infolge der Tatsache, dass Variolavirus ein obligat humanpathogener Krankheitserreger ist, die Menschenpocken auszurotten. Trotz der Eradikation des Variolavirus gibt es auch heute noch andere Orthopockenviren, deren Verbreitung als Zoonoseerreger weltweit durch öffentliche Gesundheitssysteme überwacht wird. Vor allem Infektionen mit Affenpockenviren oder auch mit dem Kuhpockenvirus können zu gefährlichen Erkrankungen, insbesondere bei immunsupprimierten Personen, führen. Interessanterweise lassen sich hierbei die Vertreter der Orthopockenviren in zwei Untergruppen einteilen. Zum einen die Orthopockenviren wie Vacciniavirus oder das Kuhpockenvirus, die eine Vielzahl verschiedener Wirbeltierwirte infizieren können. Dagegen stehen die wirtsspezifischen Orthopockenviren mit Vertretern wie dem Variolavirus oder dem Ektromelievirus, der Erreger der Mäusepocken, die auf eine einzige Wirtsspezies angewiesen sind. Charakteristisch für die wirtsspezifischen Orthopockenviren ist, dass sie in ihrem Wirt zu einer fatalen systemischen Krankheit führen, die meist mit einer hohen Mortalität einhergeht. Dagegen induzieren die Orthopockenviren mit breitem Wirtsspektrum eher moderate klinische Verlaufsformen. Bis heute ist weitgehend unverstanden, warum in-

nerhalb eines Virusgenus diese massiven Unterschiede im induzierten Krankheitsbild auftreten, vor allem da im Vergleich der heute vielfach verfügbaren Genomsequenzen hohe Übereinstimmung bei den einzelnen Orthopockenspezies auffällt. Trotz der heutzutage verbesserten technischen Möglichkeiten versteht man nicht, welche Faktoren für das Auslösen einer schweren Infektion in einem bestimmten Wirt verantwortlich sind. Eine sehr wichtige Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang wahrscheinlich den sogenannten regulatorischen Virusgenen zu, die sich für die wirtsspezifischen Orthopockenviren im Laufe einer langen Ko-Evolution sehr genau an ein bestimmtes Wirts(immun)system adaptiert haben. Demgegenüber besitzen die immunmodulierenden Faktoren der Viren mit breiterem Wirtsspektrum vermutlich auch eine breitere regulatorische Wirksamkeit. Die Entwicklung neuer Forschungsansätze ist wichtig, um die für Wirtsauswahl und Pathogenität essentiellen viralen Faktoren zu identifizieren und deren Funktion bei der Interaktion der Erreger mit dem Wirtsorganismus besser zu verstehen.

Diese Arbeit soll durch die Generierung und Untersuchung von neuartigen rekombinanten Marker-Ektromelieviren dazu beitragen, molekulare Grundlagen und Pathogenese von Infektionen mit hoch virulenten und wirtsspezifischen Orthopockenviren besser charakterisieren zu können

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Geschichte der Pockenviren

Die ersten geschichtlichen Hinweise auf Pockenviren gehen zurück bis auf das 2. Jahrtausend vor Christus. An ägyptischen Mumien konnten Narben auf der Haut entdeckt werden, die Variolavirus spezifischen Pockenläsionen entsprechen könnten. Weitere Hinweise für das frühgeschichtliche Auftreten von Pockenviren liefern zahlreiche Beschreibungen über verlustreiche Seuchen, die mit Hautausschlag und Geschwüren einhergingen. In Europa wurden die Pocken erstmals im 6. Jahrhundert nach Christus erwähnt, während der europäischen Eroberungszüge nach Amerika verbreitet und lösten dort bei Indianern verheerende Epidemien aus.

Im Laufe des 18. Jahrhundert häuften sich Beobachtungen, dass Melkerinnen und andere Personen, die in regelmäßigen Kontakt zu mit Kuhpockenviren infizierten Tieren standen, weniger häufig bzw. weniger fatal an den Pocken erkrankten.

Diese scheinbare Schutzwirkung einer durchgemachten Infektion mit dem ungefährlicheren Kuhpockenvirus wurde durch die Experimente des englischen Landarztes Edward Jenner bewiesen. Jenner applizierte einem Jungen namens James Philipps Material aus einer Kuhpockenläsion mit einer Nadel in die Haut. Vier Wochen später führte er eine Belastungsinfektion mit Variolavirus durch, und der Junge erkrankte nicht (Fenner, 1988). Jenner beschrieb damit erstmals die Prozedur einer erfolgreichen Immunprophylaxe und gilt daher zu Recht als der Erfinder der Impfung.

Über die nächsten zwei Jahrhunderte setzte sich die Impfung als wichtigste Maßnahme zur Bekämpfung gefährlicher Infektionskrankheiten immer mehr durch. Variolavirus ist aber bis heute der einzige Erreger einer Infektion des Menschen, der durch kontinuierliche Impfprogramme weltweit ausgerottet wurde. Auf das Jahr 1977 datiert der letzte beobachtete Fall von Menschenpocken in Somalia. 1980 erklärte Frank Fenner vor der WHO in Genf die Vernichtung aller natürlich auftretender Variolaviren und den endgültigen Erfolg einer jahrhundertelangen Bekämpfung der Pocken.

Aber noch heute handhaben unter strengen Sicherheitsauflagen zwei Laboratorien auf der Welt die gefährlichen Variolaviren, das Center for Disease Control and Prevention (CDC) in Atlanta, USA, und das Forschungszentrum VEKTOR in Novosibirsk, Russland. Die Untersuchungen sollen für den Fall eines Wiederauftretens der Menschenpocken die notwendigen Erkenntnisse für eine möglichst wirksame erneute Bekämpfung sichern, die Notwendigkeit weiterer Arbeiten mit Variolaviren ist aber umstritten (Kaiser, 2011).

Heute, mehr als 20 Jahre nach der Ausrottung scheint die Gefahr einer neuen Bedrohung des Menschen durch virulente Pockenviren gewachsen zu sein. Zum einen steigt die Befürchtung hoch pathogene Pockenviren könnten aus Laboratorien versehentlich entkommen, entwendet werden oder gar illegal mittels moderner Bioverfahren synthetisch hergestellt werden. Zum anderen steigt die Anzahl der Infektionen mit zoonotischen Orthopockenviren in den letzten Jahren wieder deutlich an. Gleichzeitig nimmt die während der Pockenimpfkampagne weltweit aufgebaute Immunität in der Bevölkerung rapide ab (Rimoin et al., 2010). Es erscheint aus biologischer Sicht daher nur eine Frage der Zeit, bis ein Vertreter der Orthopockenviren die ökologische Nische Mensch wieder besetzen wird.

2. Die Familie der Pockenviren

Die Familie der Pockenviren besteht aus zwei Unterfamilien, den Entomopoxvirinae, die Insektenpockenviren und den Chordopoxvirinae, die Pockenviren der Wirbeltiere. Die Chordopoxvirinae lassen sich in acht verschiedene Genera unterteilen. Deren Vertreter umfassen eine Vielzahl an human- und tierpathogenen Pockenviruspezies wie in Tabelle 1 dargestellt.

Die bekanntesten Pockenviren sind sicher die Orthopockenviren mit Vertretern wie Vacciniavirus, dem Virus, das während des Bekämpfungsprogramms der WHO als Impfstoff verwendet wurde, sowie Variolavirus. Das Genus der Orthopockenviren lässt sich weiter in zwei Untergruppen einteilen, in die Orthopockenviren, die viele verschiedene Wirte infizieren kön-

nen, wie z.B. Kuhpockenviren, die Affenpockenviren oder Vacciniaviren. Dagegen steht die Gruppe von Viren mit sehr engem Wirtsspektrum, d.h. mit nur einem Wirt, an den sich das Virus stark angepasst hat und der mit sehr hoher Effizienz infiziert werden kann. Zu dieser Gruppe gehören die Variolaviren, die Mäusepockenviren (Ektromelieviren) und die Kamelpockenviren.

Vacciniavirus nimmt eine herausragende Stellung ein aufgrund seiner Verwendung als Impfstoff zur Eradikation der Variolaviren. Infolgedessen basiert ein Großteil bisheriger Erkenntnisse in der Pockenvirusforschung auf Untersuchungen mit Vacciniavirus.

Tabelle 1: Taxonomie der Familie *Poxviridae* und charakteristische Vertreter (Smith, 2007)

Unterfamilie	Genus	Typische Vertreter
<i>Chordopoxvirinae</i>	Orthopoxvirus	Variola-, Vaccinia-, Ektromelie-, Kamelpocken-, Kuhpocken-, Affenpocken-Virus
	Parapoxvirus	Pseudokuhpocken-, Orf-Virus
	Avipoxvirus	Hühnerpocken-, Taubenpocken-, Kanarienvpocken-Virus
	Capripoxvirus	Ziegenpocken-, Schafpocken-, Lumpyskin-Disease-Virus
	Leporipoxvirus	Myxomatosevirus, Fibromatoseviren der Hasen, Kaninchen, Eichhörnchen
	Suipoxvirus	Schweinepocken-Virus
	Molluscipoxvirus	Molluscum-contagiosum-Virus
	Yatapoxvirus	Tanapocken-, Yabapocken-Virus
<i>Entomopoxvirinae</i>	α -Entomopoxvirus	Pockenviren der Käfer, Schmetterlinge, Dipteren (Fliegen und Mücken) und ihrer Larven
	β -Entomopoxvirus	
	γ -Entomopoxvirus	

3. Der Aufbau von Pockenviren

Pocken sind ca. 150-250 nm x 250-350 nm große DNA Viren, die bereits im Lichtmikroskop sichtbar sind. Im Elektronenmikroskop sind Oberflächenstrukturen der ziegelsteinartigen Viruspartikel zu erkennen (siehe Abbildung 1). Diese bilden charakteristische unregelmäßig angeordnete filamentöse Strukturen und stellen sich nur bei den Parapockenviren anders dar. Dort sind die Oberflächenfilamente regelmäßig strukturiert, und das elektronenmikroskopische Bild des Partikels erinnert an einen Bienenkorb.

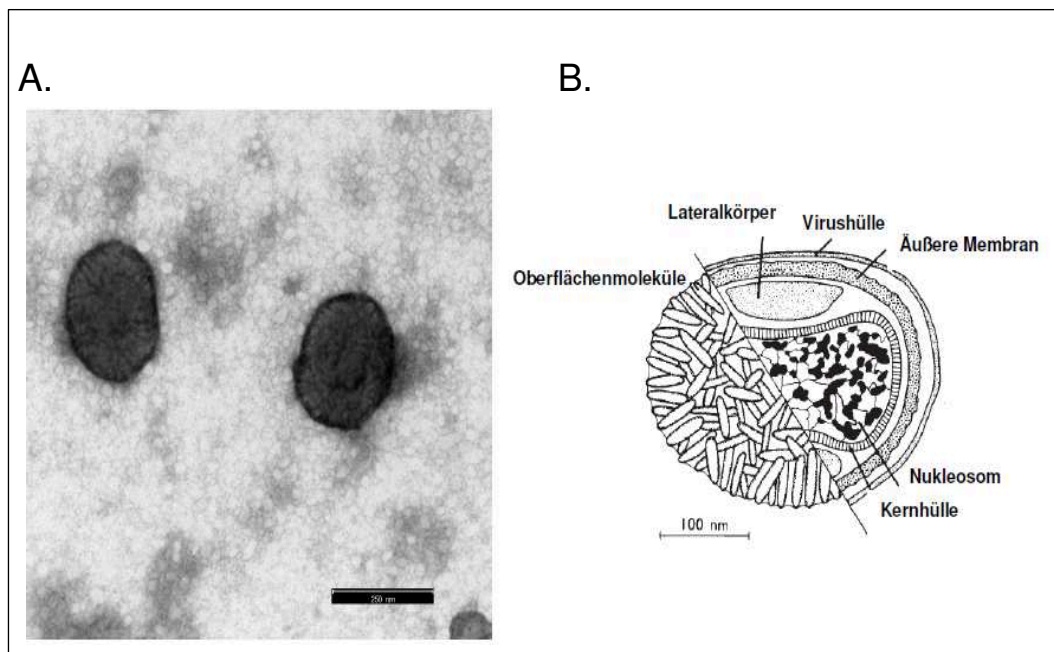


Abbildung 1: A= Elektronenmikroskopische Aufnahme von Virionen des Ektromelievirus, B= Schematische Darstellung Aufbau eines Pockenviruspartikels, modifiziert nach Fenner, 1988.

Das bikonkave Viruskapsid der Pockenviren beinhaltet das DNA-Genom, verpackt zusammen mit viralen Strukturproteinen und allen Enzymen für die frühe virale Transkription. Pockenviren bilden verschiedene Formen infektiöser Viruspartikel, die sich während des Lebenszyklus entwickeln. Diese unterscheiden sich in der Anzahl an Membranen, die als äußere Hülle das Viruskapsid umgeben. Die einfachste und häufigste Form reifer Viruspartikel sind die sogenannten Intrazellulären Virionen (IMV für engl. „intracellular mature virion“), die von nur einer Lipidmembran umgeben werden. Die wichtigste zweite Form, die Extrazellulären Virionen (EV), bestehen aus IMV mit einer zusätzlichen Hüllmembran. Die EV machen den geringeren Teil der neu gebildeten Viren aus (meist <10 %). Die Partikel lösen sich von den infizierten Zellen, erlauben eine rasche Infektion benachbarter Zellen bzw. Gewebe und sind auch für die virämische oder lymphatische Ausbreitung des Virus innerhalb eines Wirtsorganismus verantwortlich. Dagegen bleiben die im Zytoplasma der infizierten Zelle gebildeten IMV (ca. 90 % der gesamten Infektiosität) mit Zellmaterial fest assoziiert, weisen eine hohe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen auf und sind vermutlich vor allem für die Weitergabe des Virus an neue Wirte wichtig.

4. Das Virusgenom

Das Genom aller Pockenviren setzt sich aus linearer doppelsträngiger DNA (ds DNA) zusammen und erreicht je nach Gattung bzw. Spezies eine Größe von 130 bis 300 Kilobasenpaaren. Beide Enden des DNA-Doppelstrangs bilden terminale Haarnadelschleifen, d.h. sie sind kovalent zu einem einheitlichen Molekül verbunden. Die Basensequenz, die sich direkt an diese Endstruktur anschließt, wiederholt sich am anderen Ende, aber in umgekehrter Reihenfolge und wird als Inverted Terminal Repeat =ITR bezeichnet (Baroudy et al., 1982; Wittek et al., 1980; Wittek and Moss, 1980). Die ITR und die terminalen Haarnadelschleifen sind wichtige Strukturen für den Mechanismus der Replikation der viralen DNA.

Die DNA der Pockenviren kodiert für 150 bis 200 offene Leserahmen (ORF, engl. „open reading frame“) oder Gene, die in weiten Bereichen des Genoms nicht überlappen und keine unterbrechenden Intronsequenzen aufweisen.

Die Nomenklatur der Gene basiert auf der Kartierung des Genoms des Vacciniavirus nach Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *HindIII*. Die verschiedenen *HindIII*-Restriktionsfragmente der DNA werden nach Molekulargewicht aufgetrennt und beginnend mit dem größten Fragment in alphabetischer Reihenfolge mit Großbuchstaben (z.B. A) benannt. Die auf einem *HindIII*-Abschnitt vorliegenden ORF sind von rechts nach links durchnummeriert (z.B. A56). Der Buchstabe R für rechts oder durch L für links gibt an, in welcher Richtung das Gen abgelesen wird. So steht dann zum Beispiel A56R (kodiert das Protein Hämagglutinin) für das 56. Gen im *HindIII* A-Fragment des Vacciniavirus, das zum rechten Genomende hin transkribiert wird.

Der zentrale Bereich des Genoms umfasst ca. 100 bp DNA mit Genen, die konserviert bei allen Vertretern der Orthopockenviren vorliegen. Diese Gene kodieren überwiegend für virale Strukturproteine sowie essentielle Enzyme und Faktoren für die DNA-Replikation sowie die Transkription und Modifikation viraler RNA.

Dagegen sind die Gensequenzen an den Genomenden variabel und in Anzahl bzw. Art der hier angeordneten ORF häufig typisch für bestimmte

Viren. Diese meist nicht-essentiellen Gene erlauben auch die Synthese von Proteinen, die die Auseinandersetzung der Viren mit ihren Wirtssystemen (im Sinne des Virus) regulieren sollen. Viele dieser Proteine dienen vermutlich der Schwächung der Immunabwehr und einige konnten bereits als wichtige Virulenzfaktoren identifiziert werden.

5. Der Lebenszyklus der Pockenviren

Pockenviren sind die einzigen DNA Viren, deren Lebenszyklus ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle abläuft. Dies bedingt, dass Pockenviren auch alle für den Lebenszyklus benötigten Enzyme selbst mitbringen bzw. selbst für diese kodieren. Der Lebenszyklus beginnt mit der Anlagerung eines Virions an eine empfängliche Zelle, gefolgt von der Aufnahme des Viruskapsids in die Zelle. Verschiedene Proteine auf der Oberfläche des Viruspartikels vermitteln die Bindung an die Zelle durch Interaktion mit Glykosaminoglykanen, wie Heparansulfat oder Chondroitinsulfat (Chung et al., 1998; Hsiao et al., 1998; Lin et al., 2000; Rodríguez et al., 1998). Schon während des Eintrittes in die Zelle beginnen die mit der viralen DNA im Innern des Kapsids assoziierten Enzyme mit dem Uncoating, dem Freilegen der viralen DNA. Das Viruskapsid wird zu zellkernnahen Bereichen im Zytoplasma transportiert und dort vollständig entpackt. Es bilden sich dann spezielle, scheinbar abgegrenzte Zonen, sogenannte Virusfabriken (engl. „*Viral Factories*“), in denen der weitere Lebenszyklus des Virus abläuft.

Die genauen Mechanismen, mit denen die verschiedenen infektiösen Formen der Pockenviren in die Zelle eintreten, sind zum Teil noch unbekannt. Sicher ist, dass die IMV und die EV hierfür unterschiedliche Wege nutzen. So besitzen sie auch unterschiedliche Oberflächenproteine und infizieren verschiedene Zelllinien mit unterschiedlicher Effizienz. Ein relativ einfaches Modell über den Eintritt sieht vor, dass die Hüllmembran der IMV mit der Zellmembran fusioniert und so das Core direkt ins Zytoplasma entlässt. Ein weiteres Modell beschreibt einen Weg der Endozytose, bei dem das IMV durch Aktin-vermittelte Makropinocytose in die Zelle aufgenommen wird. An der Verschmelzung von Virushülle und Zellmembran ist

immer der sogenannte *Entry Fusion Komplex* aktiv beteiligt, der aus mindestens zwölf Oberflächenproteinen des IMV besteht (Mercer and Helenius, 2009; Moss, 2006; Roberts and Smith, 2008; Senkevich et al., 2005).

Noch etwas komplexer sind die vermutlich von den EV verwendeten Mechanismen zum Zelleintritt. Die in der äußeren Hüllmembran des EV integrierten Virusproteine sollen die Entfernung dieser äußeren Membran katalysieren und so den normalen Eintrittsweg des IMV freimachen. Nach speziellen zellulären Rezeptoren, die den Pockenviruspartikeln ihren Eintritt in die Wirtszelle vermitteln, wird bereits seit langer Zeit gesucht. So schlugen Eppstein und Mitarbeiter den Epidermalen Wachstumsfaktor EGF als möglichen Rezeptor vor (Eppstein et al., 1985). Auch Chemo-kinrezeptoren wurden für vielversprechende Kandidaten gehalten, die Pockenviren binden zu können (Lalani et al., 1998). Die Ergebnisse neuerer Studien sprechen aber für eine Beteiligung mehrerer redundant auftretender Oberflächenmoleküle, welche es den Viren ermöglichen eine Vielzahl verschiedener Wirtszellen zu binden und deren genaue Identität es aber noch zu entschlüsseln gilt (zur Übersicht s. Roberson & Smith 2008, Mercer & Helenius 2009).

6. Virale Transkription und Morphogenese

Der Transkriptionsapparat der Pockenviren umfasst neben einer viralen DNA-abhängigen RNA-Polymerase eine Vielzahl weiterer viruseigener Enzyme und Faktoren. Charakteristisch für die Genexpression der Pockenviren ist, dass sie kaskadenartig in drei Stufen abläuft, beginnend mit einer frühen Phase, gefolgt von der intermediären und dann der späten Phase der Genexpression. Der Ablauf der viralen Genexpression ist strikt reguliert, da jede Stufe der Transkription die Synthese essentieller Faktoren für die nächste Phase der Transkription beinhaltet (Broyles, 2003). Zur Übersicht siehe Abbildung 2.

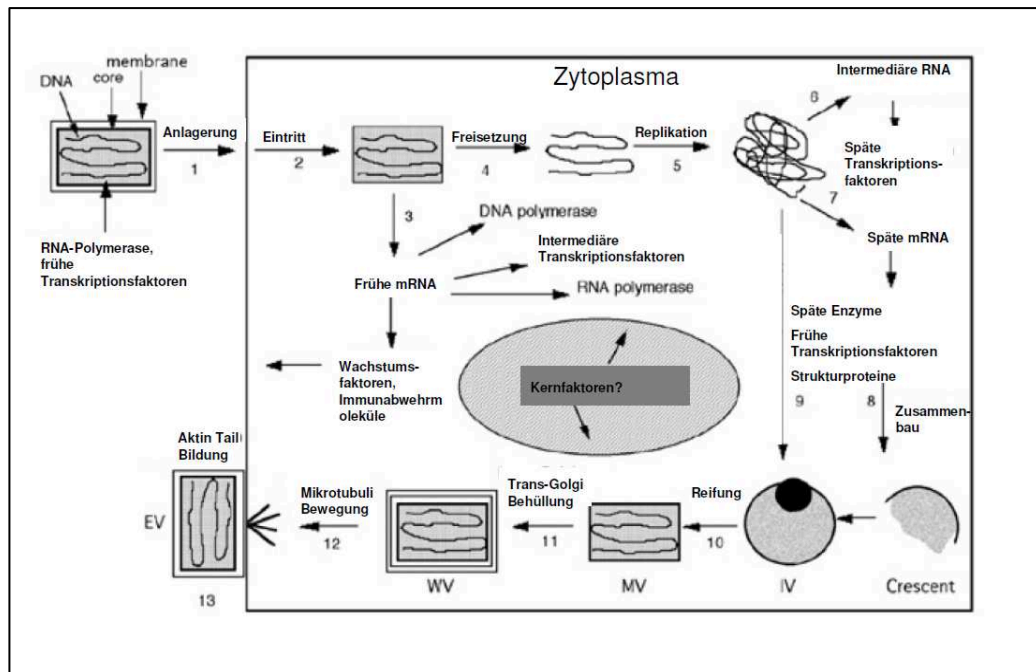


Abbildung 2: Schema der Virusmorphogenese, modifiziert nach Moss, 2010, 1 = Anlagerung und Fusion Viruspartikel mit Zelle, 2 = Abgabe des Viruscore in das Zytoplasma, 3 = Synthese der frühen mRNA, die zu verschiedenen Proteine, z.B. Wachstumsfaktoren, Immunmodulatorische Proteine, Enzyme für die DNA-Replikation und intermediäre Transkriptionsfaktoren, 4 = Freisetzung DNA, 5 = DNA-Replikation, 6 = Transkription Intermediärer Gene mit Synthese später Transkriptionsfaktoren, 7 = Späte Gene werden transkribiert mit der Synthese Strukturproteine, früher Transkriptionsfaktoren, 8 = Zusammenbau des Viruspartikels, 9 = Konkatermere DNA Strukturen werden aufgelöst und replizierte DNA wird in neue Partikel verpackt, 10 = Reifung des Virions beginnt, 11 = Reife Virionen werden im Golgi-Apparat mit zusätzlichen Membran ausgestattet, 12 = behüllte Virionen werden zur Zelloberfläche transportiert und durch Fusion ausgeschleust, 13 = Bildung der Aktin Tail zur Verteilung der behüllten Virionen Schematische Darstellung viraler Morphogenese

Schon während des Eintrittsvorgangs in die Zelle beginnt die RNA-Polymerase mit der Transkription der frühen Gene an der im Kapsid entpackten genomischen DNA. Die frühen Gene kodieren neben Faktoren zur Steuerung der Virus-Wirt-Interaktion auch die essentiellen intermediären Transkriptionsfaktoren. Zeitgleich mit der intermediären Phase der viralen Transkription beginnen auch die DNA-Replikation und die Synthese der späten Transkriptionsfaktoren (Baldick and Moss, 1993). Die Produkte der späten Genexpression beinhalten neben den viralen Strukturproteinen auch die RNA-Polymerase, die frühen Transkriptionsfaktoren und andere essentielle Enzyme, die in das Viruskapsid verpackt werden, um bei der Infektion einer neuen Wirtszelle die frühe Phase der Transkription wieder zu initiieren (Keck et al., 1990; Roberts and Smith, 2008; Smith et al.,

2002; Zhang et al., 1992).

Mit dem Einsetzen der späten Transkription beginnt der Zusammenbau der neuen Viruspartikel. Dieser als Morphogenese bezeichnete Vorgang startet mit der Bildung Protein besetzter Membranbögen, die bei der Untersuchung im Elektronenmikroskop innerhalb der Virusfabriken sichtbar werden und sich zu ovalen unreifen Viruspartikeln zusammenfügen. Nach dem Einschleusen der viralen DNA kondensieren diese unreifen, runden Partikel zu typischen quaderförmigen reifen Pockenvirionen, den bereits oben beschriebenen, einfach behüllten IMV. Diese verlassen die Zone der Virusfabrik und erhalten im Trans-Golgi-Kompartiment der Wirtszelle eine zusätzliche Doppellipidmembran als Hülle. Diese intrazellulären dreifach behüllten Viren (auch als IEV „intracellular enveloped virions“ bezeichnet) wandern am Zytoskeletton entlang zur Zelloberflächenmembran. Dort erfolgt die Fusion der äußeren Virusmembran mit der Zytoplasmamembran und so die Ausschleusung der doppelt behüllten Extrazellulären Virionen (EV) (Roberts and Smith, 2008; Smith et al., 2002).

7. DNA-Replikation

Die Pockenviren nutzen einen besonderen Mechanismus der DNA-Replikation, bei dem die räumliche Struktur des DNA-Moleküls mit den Haarnadelschleifen und den repetitiven Sequenzen am Genomende eine wichtige Rolle spielen (Pogo et al., 1981; Pogo and O'Shea, 1978; Wittek et al., 1980; Wittek and Moss, 1980). Das detaillierte Ablaufen des Replikationsmechanismus ist bis heute nicht eindeutig verstanden. In einem international anerkanntem Modell (siehe Abbildung 3) nimmt man jedoch an, dass die Replikation mit dem Aufbrechen eines der beiden DNA-Stränge im Bereich der terminalen Haarnadelschleife beginnt (1). Dem folgt das Aufklappen des unterbrochenen Stranges unter Auflösung der Haarnadelschleifenstruktur. Es entsteht ein freies 3'-OH-Ende an der DNA, an den die DNA-Polymerase anknüpfen kann und den Bereich bis zum Ende des Stranges verlängert (2). Im nächsten Schritt trennt sich der neu entstandene Doppelstrang und die beiden Einzelstränge binden sich selbst ineinander aufgrund der komplementären Basensequenz (3), so

dass ein Replikationsconcatemer (Baroudy et al., 1982; Wittek and Moss, 1980) an beiden Enden entsteht, von wo sich die DNA-Polymerase (4) weiter durch die Länge des Genoms vorarbeitet (5). Während eines Replikationsvorgangs entstehen auf diese Weise etwa 10.000 Kopien eines Genoms (6), die dann während der Morphogenese in neue Virionen verpackt und weitergegeben werden (Moyer and Graves, 1981).

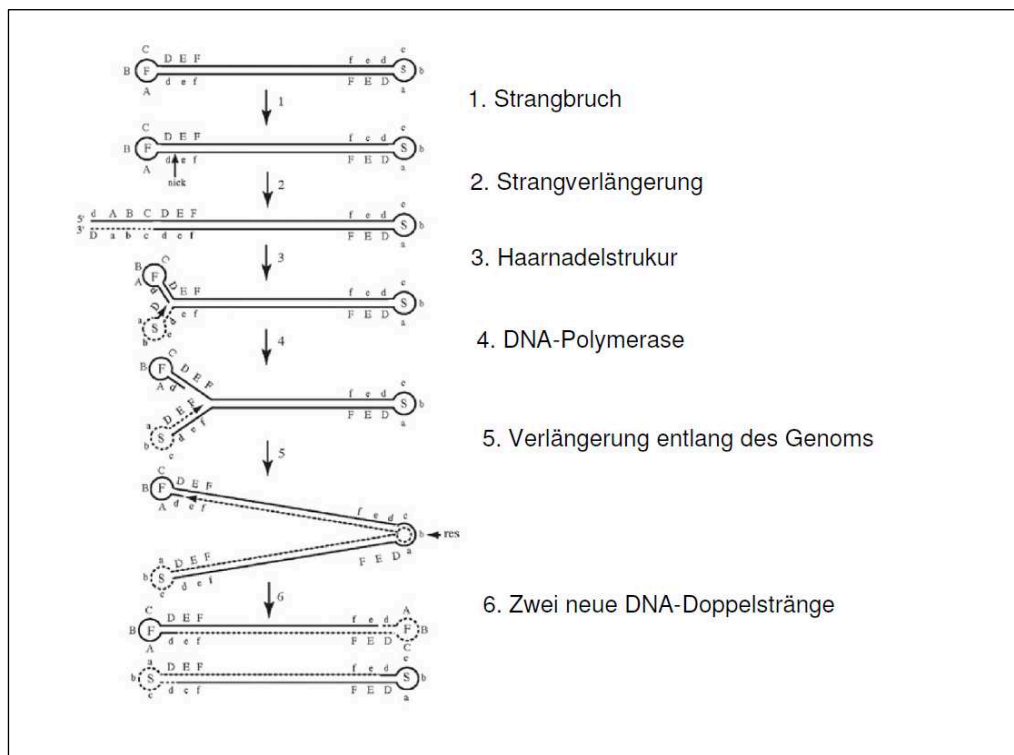


Abbildung 3: Schema der DNA-Replikation, modifiziert nach Moss, 1983

8. Pathogenese von Infektionen mit Pockenviren

Über die Faktoren, die die Entwicklung einer klinischen manifesten Erkrankung nach der Infektion mit verschiedenen Orthopockenviren induzieren ist überraschenderweise wenig bekannt. Dies liegt vor allem auch daran, dass sich der Infektionsverlauf sehr stark unterscheidet, in Abhängigkeit welches Virus welchen Wirt infiziert. Infektionen mit wirtsspezifischen Viren führen zu einer generalisierten, systemischen Infektion mit hoher Morbidität und Mortalität im bevorzugten Wirt, wie zum Beispiel beschrieben für die Mäusepocken der Maus oder die echten Pocken (*Variola vera*) des Menschen. Dagegen können Orthopockenviren, wie zum Beispiel die in Mitteleuropa heimischen Kuhpockenviren, eine Vielzahl ver-

schiedener Wirte infizieren, sind aber in der Regel Erreger von Lokalinfektionen mit relativ mildem Verlauf und Entwicklung differenzierter Hautveränderungen (Buller, 1991; Damon, 2007). Allgemeine Symptome, die vor allem den Beschreibungen der Menschenpockenerkrankung entstammen, sind hohes Fieber, Kopfschmerzen, Pneumonien unterschiedlicher Schwere aber auch spezifische neurologische Symptome mit Lähmungen oder Erblindung (Fenner, 1988). Die Pockenläsionen als pathognomonisches Merkmal bilden sich auf der Haut beziehungsweise auf Schleimhäuten und sind sowohl bei den wirtsspezifischen als auch den Orthopockenviren mit breiter Wirtsauswahl zu finden.

Bis heute sind die Pathogenesemechanismen, also wie die Orthopockenviren im Wirt interagieren sehr wenig verstanden. Sicher ist, dass die Orthopockenviren für eine Vielzahl immunmodulatorischer Gene kodieren, die zur gezielten Inhibition des Wirtsimmunsystems führen und daher eine Art „Überlebensstrategie“ darstellen (Stanford et al., 2007). Diese Immunevasionsmechanismen sind umso effizienter je genauer sie an den spezifischen Gegenspieler im Wirtssystem angepasst sind, so dass bei den wirtsspezifischen Viren eine systemische Infektion induziert wird. Zu betonen ist aber, dass es auch innerhalb der wirtadaptierten Viren nach Infektion ihres spezifischen Wirtes Unterschiede in der resultierenden Infektion gibt (McFadden, 2005). So zum Beispiel beim Variolavirus nach der intrakutanen Infektion des Menschen, als es dabei zu einem moderaten klinischen Verlauf mit deutlich reduzierter Mortalität ($>2\%$) kommt. Dagegen führt die respiratorische Übertragung des Variola virus zu einer Mortalität von bis über 30 % (Moss, 2011; Parker, 2010). Weiter zeigen auch verschiedene Wirbeltiere eine besondere Empfänglichkeit für solche Orthopockenviren die sonst in verschiedenen Wirten nur zu mildem klinischen Verlauf führen, wie zum Beispiel exotische Zootiere nach Infektionen mit den in Europa heimischen Kuhpockenviren oftmals schwere systemische Klinik zeigen. Dies impliziert, dass eine Vielzahl viraler und wirtseigener Faktoren in die Pathogenese von Pockenerkrankungen verwickelt sind und die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen von der Untersuchung eines natürlichen Virus-Wirt-Systems profitiert, wie es beim Elektromelievirus-Maus-Infektionsmodell vorliegt (Parker et al., 2009).

9. Ektromelievirus, der Erreger der Mäusepocken

J. Marchal beschrieb das Ektromelievirus erstmals 1930 als infektiöse Ursache einer viralen Infektionskrankheit mit ungewöhnlich hoher Mortalität bei Mäusen in der Tierhaltung des Nationalen Instituts für Medizinfor-schung in Hampstead, England (Fenner, 1949; Marchal, 1930). Der Name Ektromelie vom altgriechischen κροπή *ektropē* ‚Abwendung, Abweichung‘ und μέλος *mélos* ‚Glied‘ bezog sich auf Marchals Beobachtung, dass es bei infizierten Mäusen zum Auftreten schwerer Nekrosen an den Gliedmaßen kam. Nachdem die Verwandtschaft des Erregers mit anderen bis dato bekannten Orthopockenviren, wie Vaccinia- oder Variolavirus bewiesen werden konnte (Burnet, 1945), schlug Frank Fenner die Bezeichnung „Mäusepocken“ für das neu beschriebene Krankheitsbild bei Mäusen vor. Nach dem Ort seiner ersten Beschreibung wurde dieses erste Isolat des Ektromelievirus als Stamm Hampstead bezeichnet. In den folgenden Jahren konnten noch verschiedene andere Stämme des Virus in Europa und in USA bei Wildmäusen wie auch bei Labormäusen entdeckt werden (Fenner, 1949). Die Ektromelieviren unterscheiden sich in ihrer Virulenz, und der Stamm Moskau gilt als der virulenteste Vertreter.

10. Pathogenese und Pathologie der Ektromelie-Infektion

Der Pockenvirologe Frank Fenner definierte bereits vor mehr als 60 Jahren sein Modell zur Pathogenese der Mäusepocken, das bis heute abgesehen von kleinen Anpassungen weitgehende Gültigkeit besitzt (Fenner, 1949, siehe Abbildung 4). Als natürliche Infektionsroute wird bei der Maus der Eintritt des Virus über die verletzte Haut angesehen, z.B. bei Hautabschürfungen, Bissverletzungen aber auch über kontaminierte Gegenstände. Die Infektion über orale Aufnahme oder über den Respirationstrakt ist möglich, wird aber nicht als bedeutend angesehen. Die natürliche Infektion der Maus wird im experimentellen Umfeld durch die Infektion des Fußballen (engl. footpad), also die intra- bzw. subkutane Applikation des Virus am Hinterfuß nachgeahmt.

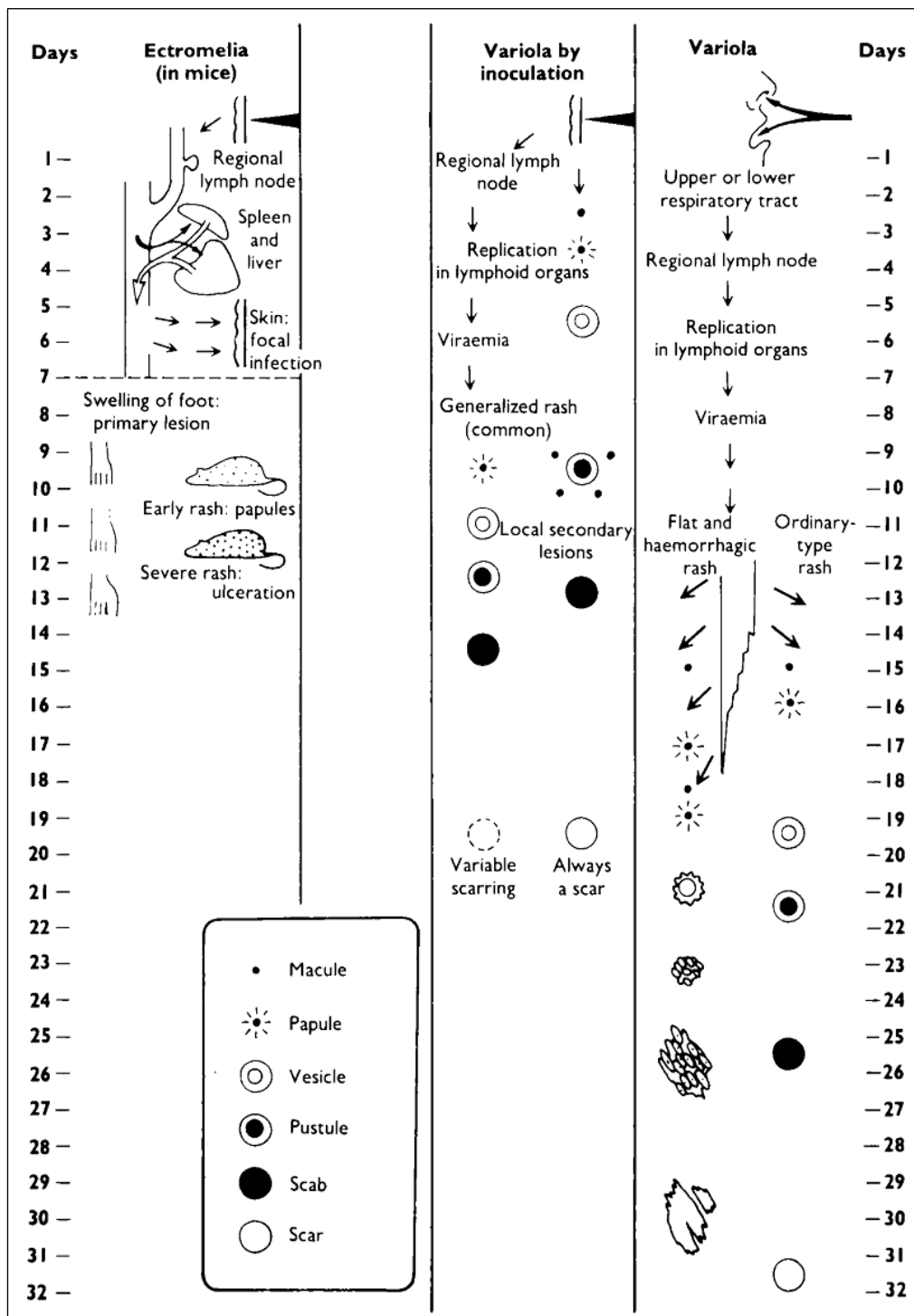


Abbildung 4: (Quelle: Fenner, 1949) Schematische Darstellung der Pathogenese der Mäusepocken

In den Organismus eingedrungen vermehrt sich das Virus lokal in der Haut, um dann zirka elf Stunden nach der Infektion (*post infectionem*; p.i.) zum regionalen Lymphknoten im Infektionsgebiet zu wandern. Dort vermehrt sich das Virus massiv und nach 3 bis 4 Tagen p.i. kommt es zu einer primären Virämie und zur Verbreitung des Virus ausgehend vom Lymphknoten über das Blutsystem und die Lymphe zu verschiedenen in-

neren Organen des Körpers. Dabei gelten vor allem die Leber und die Milz als spezifische Zielorgane für das Ektromelievirus. Aber auch andere Systeme, wie das Knochenmark, die Lunge und das Gehirn, sind als betroffene Organe beschrieben. Dort kommt es dann erneut zur Virusvermehrung und anschließend am Tag 7 bis 8 zu einer sekundären Virämie. Ab Tag 9-13 p.i. entwickeln sich die charakteristischen Pockenläsionen der Haut.



Abbildung 5: Maus im akuten klinischen Stadium der Erkrankung, mit konjunktivalen Veränderungen, Rückenkrümmung und Sträubung der Haare.

In diesem Stadium ist die akute systemische Phase der Infektion abgeschlossen. Morbidität und Mortalität sind bei den Mäusepocken sehr hoch, und die meisten Mäuse versterben bereits in der akuten Phase der primären Virämie aufgrund massiver Organnekrosen, vor allem in der Leber. Klinische Symptome einer akut systemischen Ektromelievirusinfektion sind zu Beginn Apathie, verminderter Bewegungsdrang und reduzierte Futtermittelaufnahme. Im weiteren Verlauf der Erkrankung tritt dann auch vermehrt eine respiratorische Symptomatik mit einer Konjunktivitis in den Vordergrund, begleitet von struppigem Fell und einer merklich aufgekrümmten

Rückenlinie (siehe Abbildung 5). Dieser charakteristische Verlauf der Mäusepocken dient auch heute noch als Grundlage für die Erforschung der Pathogenese von Orthopockenvirusinfektionen und kann mit Anpassungen auf den Verlauf anderer generalisierender Pockenerkrankungen übertragen werden (Buller, 1991; Esteban and Buller, 2005).

11. Biologie, Genetik und Empfänglichkeit

Das sehr enge Wirtsspektrum des Ektromelievirus erstreckt sich neben den Mäusen = Familie Muridae auch auf die Wühlmäuse = Familie Cricetidae, welche als ein natürliches Erregerreservoir gelten. Infektionen anderer Säugetierarten mit dem Virus sind nicht bekannt. Zur Zeit der Erstbeschreibung der Mäusepocken stellten Wildmäuse in den Labortierhaltungen vermutlich das größte Kontaminationspotential dar, welches auch das epidemieartige Ausbreiten der Infektion in experimentellen Tierhaltungen erklären könnte (Esteban and Buller, 2005).

Bei *in vitro* Infektionen in der Gewebekultur infiziert das Virus auch viele Zellen und Zelllinien anderen Wirtsurprungs, wie z.B. Hühnerembryofibroblasten, Zelllinien aus Nierenepithelzellen von Affen und Hamstern und Tumorzelllinien des Menschen (Chen et al., 1992). Dabei zeichnet sich die Infektion dieser Zellen aber durch unterschiedliche Effizienz der Ektromelievirusreplikation aus, und verschiedene Formen von Infektionsherden (Plaquemorphologie) werden ausgebildet.

Die Permissivität von Zellkulturen für die Ektromelieinfektion erlaubt die Untersuchung wichtiger molekularer Grundlagen der viralen Genexpression und Replikation, kann aber das hoch spezifische *in vivo* Wirtsspektrum nicht erklären. Im Vordergrund der Pathogeneseforschung steht daher weiterhin die Untersuchung der *in vivo* Infektion der Maus. Das Ektromelievirus gehört zusammen mit dem Variolavirus und dem Kamelpockenvirus zu den wirtsspezifischen Orthopockenviren.

Es ist hochinfektiös für alle bekannten Mäusestämme, aber bei der Entwicklung einer letalen Krankheit spielt der genetische Hintergrund der Maus eine wichtige Rolle. Nicht alle Mäusestämme sind gleich empfäng-

lich für die Mäusepockenerkrankung. So gelten z.B. Mäuse der Inzuchtstämme AKR/J und C57BL/6 als resistent, da sich auch nach Infektion mit relativ hohen Dosen an Infektiosität keine oder nur sehr geringe Krankheitssymptome entwickeln. Dagegen ist bei empfänglichen Stämmen, wie BALB/c oder DBA/2, bereits nach der Injektion sehr geringer Mengen von Virus ein fataler systemischer Krankheitsverlauf mit hoher Morbidität und Mortalität zu beobachten (Wallace et al., 1985). Experimentelle Untersuchung dieser verschiedenen Phänotypen der Mäusepocken-Infektion erlaubt Rückschlüsse auf die Ursachen. Bei der Immunantwort resistenter Mäuse dominiert ein durch T- Helferzellen des Types 1 = Th1 geprägtes Zytokinprofil zusammen mit einer verstärkten Aktivierung von CD8+ zytotoxischen T-Zellen. Bei empfindlichen Stämmen überwiegt dagegen eine durch T-Helferzellen des Types 2 (Th2) geprägte Zytokinausschüttung und eine B-Zellimmunantwort (Chaudhri et al., 2004; Karupiah, 1998). Des Weiteren scheinen spezielle genetische Merkmale (Resistenz-Loci) der Mäuse einen Einfluss auf die Empfänglichkeit zu haben. Diese Gensequenzen, im Englischen bezeichnet als „*Resistance to Mousepox locus*“ = *RMP locus* 1-4, sind auf verschiedenen Genen lokalisiert und werden mit der Ausbildung verschiedener Immunantworten in Verbindung gebracht (Brownstein and Gras, 1995; Esteban and Buller, 2005). So wurde zum Beispiel das RMP-locus 1 in einem Genombereich kartiert, der die Aktivierung Natürlicher Killer-Zellen (NK-Zellen) reguliert (Jarahian et al., 2011; Melo-Silva et al., 2011). Dieser Befund stimmt überein mit der Beobachtung, dass NK-Zellen eine wichtige Rolle bei der in vivo Kontrolle der Ektromelieinfektion spielen (Brownstein and Gras, 1995; Delano and Brownstein, 1995). Aufgrund des klinisch fulminanten und praktisch ausnahmslos fatalen Krankheitsverlaufs hat sich die intrakutane (*footpad*) Infektion von empfindlichen Inzuchtstämmen, wie z.B. der BALB/c Maus, als das über Jahrzehnte am häufigsten verwendete Infektionsmodell bei der Erforschung von Orthopockenvirusinfektionen etabliert. Das Ektromelievirus-Maus-Infektionsmodell profitiert dabei von der langjährigen Nutzung und der exzellenten genetischen bzw. immunologischen Charakterisierung der Maus als Labortier. Über die Funktion des Immunsystems der Maus ist vermutlich mehr bekannt als über das Immunsystem des Menschen. Die problemlose Verfügbarkeit praktisch aller immunologisch relevanten Maus-

spezifischen Antikörperreagenzien und die Existenz einer Vielzahl verschiedener gentechnisch mutierter Mauslinien (sogenannter Knockout-Mäuse), in denen bestimmte Genfunktionen gezielt inaktiviert wurden, ermöglichen die Verwendung dieses Infektionsmodells zur Erforschung grundlegender Mechanismen der Immunabwehr (Parker et al., 2009).

12. Die Mäusepocken als Modell für die *Variola vera* des Menschen

Die Ausrottung des obligat für den Menschen pathogenen Variolavirus erfolgte noch vor Verfügbarkeit wichtiger immunologischer und molekularbiologischer Technologien der modernen Medizin. Gleichzeitig fehlen vergleichbare durch Pockenviren verursachte Erkrankungen des Menschen, so dass unsere Kenntnisse zu den Grundlagen der Pathogenese und Immunabwehr von systemischen Pockenvirusinfektionen immer noch gering sind. In diesem Zusammenhang eignet sich die Untersuchung der Mäusepockenerkrankung sehr gut als Labormodell zur Evaluierung von neuen prophylaktischen und therapeutischen Ansätzen (Coulibaly et al., 2005; Esteban and Buller, 2005). Das Ektromelievirus gehört, wie das Variolavirus, zu den wirtsspezifischen Orthopockenviren. Die Genome beider Erreger stimmen in Organisation und Anzahl essentieller bzw. nicht-essentieller regulatorischer Gene in weiten Teilen überein, und beide Viren induzieren in ihrem Wirt eine gleichartig verlaufende zyklisch-systemische Infektionskrankheit (Chen et al., 2003; Gubser et al., 2004).

Bereits Frank Fenner beschrieb die Ektromelieinfektion der Maus als geeignetes System zur Erforschung der Pockenerkrankung des Menschen (Fenner, 1949). Fenner schlägt hierfür die intrakutane (footpad) Infektion hoch empfänglicher Mausstämme als Modell vor. Bei genauer Betrachtung des Krankheitsverlaufs werden aber Unterschiede im direkten Vergleich der Mäusepocken mit den Menschenpocken erkennbar. Neben dem verkürzten Krankheitsverlauf ist es bei der Ektromelievirusinfektion vor allem die Eintrittsroute über die Haut, die im Kontrast zu dem natürlichen Infektionsweg des Variolavirus über den Respirationstrakt steht (Abbildung 4). Aufgrund dieser Diskrepanz dient seit Jahren häufig die respiratorische

Infektion der Maus mit einer relativ hohen Dosis (ca. 1 Million Plaque-bildende Einheiten) Vacciniavirus (z.B. Stamm Western Reserve) als experimentelles Modell einer Orthopockenvirusinfektion (Drexler et al., 2003; Staib et al., 2006; Williamson et al., 1990; Wyatt et al., 2004).

Überraschenderweise zeigen neuere Studien mit Ektromelievirus, dass die Resistenz der C57BL/6 Maus nach intranasaler Infektion verloren geht (Paran et al., 2009; Parker, 2010). Bereits geringe Mengen an Virus, die über den Respirationstrakt appliziert werden, führen zum Ausbruch einer letalen Mäusepockenerkrankung mit noch besserer Vergleichbarkeit zur *Variola vera* des Menschen.

Der Applikationsweg entspricht der natürlichen Infektionsroute des Variolavirus und im Vergleich zur Infektion hoch empfänglicher Mausstämmen wird ein mehr protrahierter Krankheitsverlauf mit ähnlicherer Klinik induziert. Parker und Kollegen schlagen daher die intranasale ECTV-Infektion der C57BL/6 Maus als das aktuell beste experimentelle Modell für Studien zur Prophylaxe oder antiviralen Therapie der Variolavirus-Infektion des Menschen vor (Parker, 2010).

13. ECTV als Modell zur Untersuchung von Virus-Wirt-Interaktion

Pockenviren haben im Laufe ihrer Evolution eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um gezielt mit ihrem Wirt zu interagieren. Sie ermöglichen dem Virus sich effizient im Wirt zu vermehren, sich im Organismus zu verbreiten und schließlich auch sich innerhalb einer Wirtspopulation zu etablieren. Herausragende Bedeutung haben hierbei regulatorische Virusproteine, die der Schwächung der Immunabwehr des Wirtes dienen, der sogenannten Immunevasion („*Poxvirus immune evasion proteins*“) (Seet et al., 2003). Die Eigenschaften und möglichen Funktionen einiger dieser Proteine sind, insbesondere aus Arbeiten mit Vacciniavirus, bereits besser bekannt. Zum einen repräsentieren diese viralen Polypeptide Nachahmungen von zellulären Entzündungsfaktoren oder deren Rezeptoren, zum anderen interagieren sie gezielt mit Komponenten verschiedener Signalwege in der

Zelle (Bahar et al., 2011; Mossman et al., 1996; Perdiguier, 2009; Smith, 1999). So können zum Beispiel die Vacciniavirus-Proteine E3 oder F1 das Einsetzen des programmierten Zelltods (Apoptose) nach Infektion verhindern und den Ablauf eines produktiven Lebenszyklus sichern (Fischer et al., 2005; García, 2002; Hornemann et al., 2003; Lee and Esteban, 1994; Ludwig et al., 2005). Das regulatorische Protein N1, das bereits lange als Virulenzfaktor des Vacciniavirus identifiziert ist, kann *in vitro* gleichzeitig die Induktion von Apoptose und die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs hemmen (Bartlett et al., 2002; Billings et al., 2004; Cooray et al., 2007; DiPerna et al., 2004; Kotwal and Moss, 1988). Ein klarer Zusammenhang zwischen diesen Funktionen und der Rolle des regulatorischen Virusproteins N1 bei der *in vivo* Infektion kann aber bisher nicht hergestellt werden (Postigo and Way, 2012). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der natürliche Wirt des Vacciniavirus nicht bekannt ist und die Ergebnisse der Untersuchung von viralen Inhibitoren des Interferonsystems nahelegen, dass das Vacciniavirus nicht optimal an das meist verwendete Versuchstier, die Maus, angepasst ist (Alcami et al., 1999). Kürzlich konnten Gratz und Kollegen (Gratz et al., 2011) auch das N1-Homolog des Ektromelievirus als Virulenzfaktor identifizieren. Nach intranasaler Infektion der Maus ist N1 entscheidend an der systemischen Verbreitung des Virus von der Eintrittsstelle (Lunge) zu den inneren Organen beteiligt. Dies geschieht offensichtlich durch Interferenz mit der T-Zellimmunantwort des Wirtes, da eine Depletion der T-Zellen die Virulenz eines Ektromelievirus mit deletierten N1L-Gensequenzen wiederherstellen kann. Diese Ergebnisse verdeutlichen die möglichen Vorteile des Maus-Ektromelievirus-Infektionsmodells für die genaue Untersuchung der Funktion immunmodulatorischer Virusgene und viraler Virulenzfaktoren in einem optimal angepassten Wirtssystem.

14. Das Mäusepockeninfektionsmodell in der pharmazeutischen Forschung

Jahrzehnte nach der Beendigung der regelmäßigen Pockenschutzimpfung stellen die Verbreitung zoonotischer Viren und die Gefahr einer plötzli-

chen, versehentlichen oder gar absichtlichen Freisetzung humanpathogener Erreger neue Anforderungen an Orthopockenvirus spezifische Impfstoffe (zur Übersicht siehe Moss, 2011). Der Immunstatus der Weltbevölkerung sinkt rapide, so dass heute Impfstoffe gesucht werden, die im Pocken-Notfall schnell verfügbar sind und deren Applikation möglichst umgehend eine schützende Immunität induziert. In der Tat gab es während der langjährigen Impfkampagne zur Ausrottung des Variolavirus anekdotenhafte Berichte zur Schutzwirkung von Impfungen mit Vacciniavirus kurz vor oder sogar kurz nach der Exposition mit Variolavirus (Fenner, 1988; Moss, 2011; Paran et al., 2009).

Das Ektromelievirus gewinnt in den letzten Jahren an Bedeutung bei der Untersuchung der Wirksamkeit von Orthopockenvirus-spezifischen Impfstoffen und Therapeutika (Parker et al., 2012). Das Mäusepockenmodell ersetzt zunehmend die respiratorische Belastungsinfektion von Mäusen mit Vacciniavirus, die als Labormodel aufgrund der langjährigen Verwendung des Vacciniavirus als Prototyp der Orthopockenviren gut etabliert war. Mäuse der Inzuchtstämme BALB/c oder C57BL/6 werden hierfür intranasal mit Vacciniavirus (häufig mit dem virulenten Laborvirusstamm Western Reserve) infiziert (Turner, 1967; Williamson et al., 1990). Diese Infektion spiegelt die Bedingungen einer natürlichen Variolavirusinfektion via die Atemwege wider und dient somit zur Prüfung der Wirksamkeit neuer Impfstrategien (Drexler et al., 2003; Wyatt et al., 2004). Allerdings erlauben die mit dem Vacciniavirus Western Reserve assoziierte Neurovirulenz und das nach der hoch dosierten Infektion relativ rasch einsetzende Versagen der Lungenfunktion keine Überprüfung der Möglichkeit eines post-expositionellen Impfschutzes in diesem Modellsystem (Paran et al., 2009; Staib et al., 2006). Im Gegensatz zur Belastung mit Vacciniavirus ist die natürlichere Infektion der Maus mit Ektromelievirus durch eine etwa einwöchige symptomfreie Inkubationszeit gekennzeichnet (Paran et al., 2009). Impfungen kurz vor und nach Verabreichung einer tödlichen Dosis Ektromelievirus schützen die Tiere vor einer schweren, fatalen Pockenerkrankung und scheinen so die historischen Beobachtungen zur erfolgreichen Postexpositionsprophylaxe der Menschenpocken zu bestätigen (Samuelsson et al., 2008). Bei der Untersuchung solcher Notfallimpfungen

stellten Kremer und Kollegen fest, dass die zelluläre Immunität essentiell wichtig für die Protektivität gegen letale Orthopockenvirusinfektionen ist, da nach der Depletion beider T-Zell-Komponenten in Mäusen die Schutzwirkung der Impfung mit Vacciniavirus verloren geht (Kremer et al., 2012). Das Fehlen von B-Zellen oder verschiedenen Komponenten des angeborenen Immunsystems bleibt aber ohne Einfluss auf die protektive Wirkung der Immunisierung. In diesem Zusammenhang bietet die Ektromelieinfektion der Maus ein einzigartiges experimentelles System, das die spezifische Evaluierung der Wirksamkeit einer zellulären Immunantwort nach Impfung erlaubt. Neue Forschungsansätze zielen hier jetzt auf die Anregung verbesserter T-Zellimmunität, welche als wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von wirksamen Impfstoffen gegen schwierig zu bekämpfende Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel AIDS, Tuberkulose oder Malaria, gilt.

15. Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen im Virusinfektionsmodell

Zum besseren Verständnis der Pathogenese einer Viruserkrankung sind genaue Kenntnisse über einzelne Schritte des Infektionsprozesses im Organismus essentiell, dazu gehört die Information welchen Eintrittsweg das Virus wählt oder in welchen Zellen die Virusreplikation bevorzugt abläuft (MC Gavern & Kang, 2011). Wichtig sind auch Kenntnisse wie sich das Virus im Körper verbreitet, wo der Erreger durch das Immunsystem des Wirtes aufgehalten wird und ob er spezifische Transportvehikel benutzt um der Immunabwehr zu entgehen (Rouse & Sehrawat, 2010). Mit den experimentell etablierten Systemen ist die Detektion des Virus im Organismus meist nur „verzögert“, außerhalb der Infektionsdynamik eines lebenden Organismus, möglich. In der klinischen Virusdiagnostik erfolgt der Nachweis standardmäßig auf drei unterschiedlichen Wegen. Dazu dient einerseits der direkte Virusnachweis, beispielsweise mit Hilfe des Licht- oder Elektronenmikroskop und andererseits der indirekte Nachweis durch die vom Virus im Wirt induzierte Immunantwort, wie zum Beispiel die Messung von virusspezifischen Antikörpern. Demgegenüber steht die Isolierung

rung und Anzüchtung des Virus in vitro in der Zellkultur oder im bebrüteten Hühnerei. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen ermöglichen unter der Miteinbeziehung der phänotypisch sichtbaren Krankheitssymptome eine zuverlässige Diagnostik, die auch die Auswahl einer geeigneten Therapie begünstigt (Doer, 2010). Die Virusforschung bedient sich vielfach der gleichen diagnostischen Möglichkeiten, wie zum Beispiel der Rücktitration der Viruslast in verschiedenen Organen nach Infektionsversuchen oder auch der Ermittlung einer virusspezifischen Immunantwort. Sehr wichtig für Aussagekraft einer solchen verzögerten Analyse ist die Qualität der Probenkonfiguration, das bedeutet, wann, in welchem Gewebe und wie die Untersuchung erfolgt. Die Auswahl passender Untersuchungskriterien gestaltet sich vor allem für unzureichend charakterisierte oder neue Viren sehr schwierig. So kann allein die Wahl des falschen Zeitpunktes oder nicht infizierten Gewebes zu artifiziellen Ergebnissen führen. Außerdem sind solche Artefakt-belasteten Daten nicht ohne weiteres in einen kausalen Zusammenhang mit den bei Versuchstieren beobachteten klinischen Symptomen zu bringen. Die exakte Beschreibung einer Virusinfektion und das Verständnis der zugrunde liegenden Pathogenesemechanismen erfordert daher die Entwicklung neuer innovativer Untersuchungsmethoden. Sehr vielversprechend erscheint die Untersuchung physiologischer Prozesse in vivo unter Beibehaltung der natürlichen Dynamik durch die Expression von Reporterproteinen, deren Aktivität durch die Lichtemission verschiedener Wellenlänge messbar ist (Contag et al., 1997; Wu et al., 2001; Lin et al., 2009). Dieses als Biolumineszenz bezeichnete Verfahren findet auch in der Erforschung der Biologie von Virusinfektionen zunehmende Anwendung. Ein Beispiel für ein solches System ist das Luciferase-Luciferin-Leuchtsystem. Luciferasen sind spezielle Enzyme, die bei verschiedenen leuchtenden Käfern oder Korallenarten vorkommen. Sie katalysieren die Spaltung des natürlichen Substrats Luciferin, bei dessen Zerfall die freiwerdende Energie als Licht sichtbar wird. In der Biotechnologie verwendet man meist die vom Leuchtkäfer *Photinus physalis* abstammenden „Firefly Luciferase“ und die von der Qualle *Renilla reniformis* isolierten Luciferasen. Neben dem spezifischen Luciferinsubstrat unterscheiden sich diese Enzyme auch in der Wellenlänge des emittierten Lichtes. *Renilla reniformis* lässt Licht der Wellenlänge 481 nm entstehen und

die „*Firefly-Luciferasen*“ emittieren im Bereich von 560 nm. Oft werden beide Reporter auch gleichzeitig in einem Versuchsansatz verwendet, da die unterschiedliche Farbe ihres emittierten Lichtes die Markierung von mehr als einem Faktor erlaubt. Dazu inseriert man zunächst die Luciferase-Gensequenzen unter der Kontrolle eines virusspezifischen Promotors in die Virusgenome. Innerhalb des Virusreplikationszyklus wird dann auch Luciferase gebildet, die nach der Zugabe ihres spezifischen Substrates die Bildung von Licht katalysiert. So kann auch im *in vivo* Experiment der Grad der Virusvermehrung direkt durch die Messung des emittierten Lichtes mit Hilfe entsprechender Detektionssysteme quantifiziert und in Zusammenhang mit der Viruspathogenese gebracht werden (Luker et al., 2002; Luker & Luker, 2010).

Eine weitere Methode zum direkten Nachweis einer *in vivo* ablaufenden Virusinfektion ist die Markierung von Viren mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzproteine, wie zum Beispiel dem Grün Fluoreszierenden Protein GFP (= englisch *green fluorescent protein*) oder auch dem *Red fluorescent protein* = *RFP*, das Licht im roten Wellenlängenbereich emittiert. Auch in diesem Ansatz baut man das für das Fluoreszenzprotein kodierende Gen in das Virusgenom ein und detektiert die Fluoreszenz nach Anregung durch eine externe Lichtquelle (Mahlknecht et al., 2000; Pierson et al., 2005).

16. Das Grün-Fluoreszierende Protein GFP

Osamu Shimomura entdeckte im Jahr 1961 das GFP als er die Biolumineszenz von Quallen erforschte (Shimomura et al., 1962). *Aequorea victoria* ist eine Quallenart, die im Pazifischen Ozean verbreitet ist (siehe Abbildung 6).

Am äußeren Rand ihres Glockenkörpers sind hell fluoreszierende Punkte erkennbar, die einer Kombination aus Chemilumineszenz und Biolumineszenz entsprechen (siehe Abbildung 7).

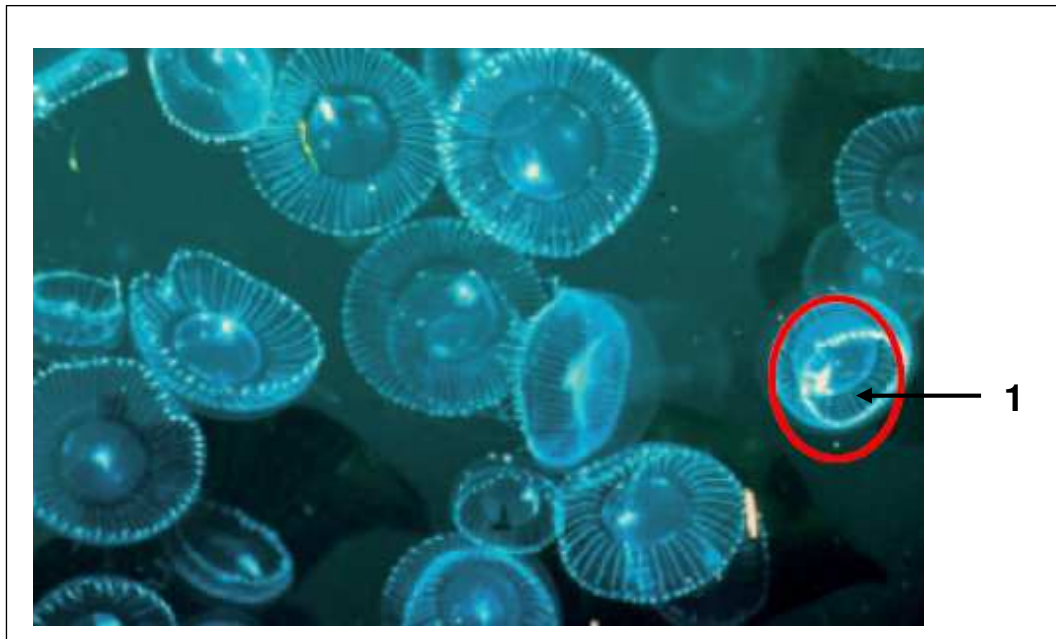


Abbildung 6: modifiziert nach Shimomura 2008, *Aequorea victoriae* im Meer, 1= Leuchtkranz auf Ventralseite der Qualle

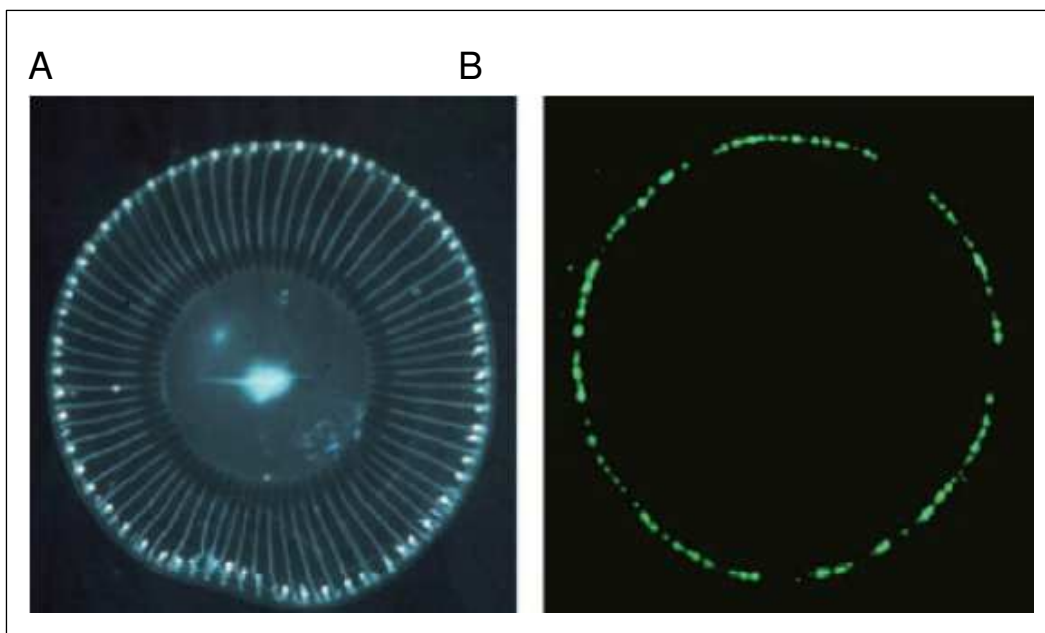


Abbildung 7: A: *Aequorea aequorea* bei Tageslicht im Meer Dorsale Ansicht; B: *Aequorea aequorea* in vitro nach Stimulation durch UV-Licht (Quelle: modifiziert nach Shimomura 2008)

Die Chemilumineszenz entsteht durch das in Anwesenheit von Kalzium aktivierte Phosphoprotein *Aequorin*, das blaues Licht emittiert. Zusätzlich überträgt *Aequorin* durch den sogenannten *Förster-Resonanzenergietransfer* Energie auf das Biolumineszenzprotein GFP, so dass die spezifische Leuchtwirkung der Qualle entsteht. GFP emittiert nach Absorption von blauem Licht grünes Licht der Wellenlänge 509 nm. Nach weiteren

Analysen gelang es Shimomura 1979, die aus 238 Aminosäuren bestehende Proteinstruktur des GFP zu entschlüsseln (siehe Abbildung 8) und ermöglichte Douglas Prasher so die synthetische Herstellung von GFP (Shimomura, 1979; Prasher et al., 1992).

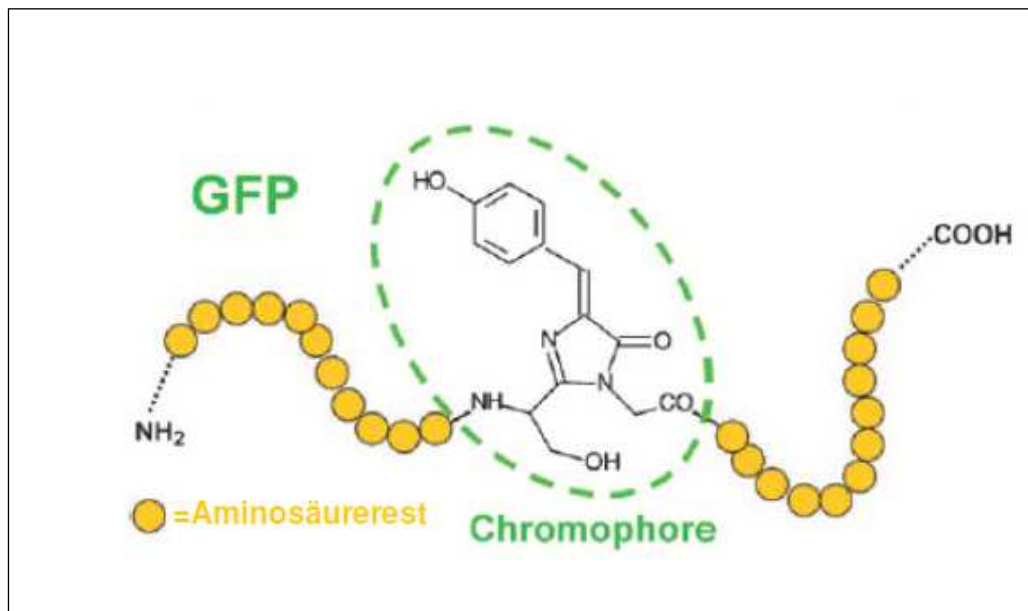


Abbildung 8: modifiziert nach Shimomura 2008. Schematische Darstellung der funktionellen Struktur von GFP, dabei ist die Chromophorstruktur innerhalb der Aminosäurestruktur eingelagert

Martin Chalfie beschrieb 1994 erstmals die Verwendung von GFP zur Markierung der Genexpression in verschiedenen lebenden Zellen prokaryontischen und eukaryontischen Ursprungs. Dazu wird die Sequenz des *gfp* Gens mit dem zu untersuchenden Gen fusioniert und durch Bestrahlung mit ultravioletttem Licht das grüne Leuchten induziert. Vorteilhaft ist hierbei, dass die Bildung des Fluoreszenzproteins keinen toxischen Einfluss auf die Zellen hat und das Wachstumsverhalten von Zellen unbeeinflusst bleibt (Chalfie et al., 1994).

Heute wird GFP in der Biotechnologie regelmäßig zur Erforschung von Signalwegen und Proteinfunktionen in der lebenden Zelle eingesetzt. Für seine Pionierarbeiten auf diesem Gebiet erhielt Shimomura im Jahr 2008 den Nobelpreis für Chemie. Mittlerweile gibt es eine Reihe von Varianten des GFP. Das natürlich vorkommende GFP besitzt zwei Anregungsmaxima, das erste bei 395 nm und das zweite bei 475 nm. Die verschiedensten heute verfügbaren Varianten des GFP variieren neben ihrer Stärke

eGFP= *enhanced GFP* auch durch die emittierten Farben, z. B. das Yellow Green Fluorescent protein *YGFP* emittiert gelbes Licht und das Cyan Green Fluorescent protein *CGFP* leuchtet lila (Heim et al., 1995; Heim & Tsien, 1996; Zhang et al., 1996; Wachter, 1998). So können innerhalb eines Experimentes mehrere Proteine durch verschiedene Farben markiert werden und ermöglichen damit die dynamische Erfassung der zu untersuchenden biologischen Vorgänge. GFP wird seit einigen Jahren auch zur Markierung von Viren eingesetzt. Dies ermöglicht die Nachverfolgung der Verbreitung der Viren im Wirtsorganismus. Diesbezüglich gelang es von Messling und Kollegen 2004 nach dem Einbau der *gfp* Gensequenz in das Genom des Staupevirus das lymphatische Gewebe erstmals als primäres Zielgewebe dieses Morbillivirus zu identifizieren und somit völlig neue Erkenntnisse zur Pathogenese der bereits lange bekannten Infektionskrankheit Staupe zu erhalten (Von Messling et al., 2004).

Auch De Vries und Kollegen erhoben nach der GFP-Markierung von Masernviren bemerkenswerte neue Daten zur Dokumentation der Virusausbreitung nach intranaler Infektion in Frettchen. Diese Ergebnisse unterstreichen die exzellente Eignung der Fluoreszenzproteine zur Untersuchung der Viruspathogenese im lebenden Organismus (De Vries et al., 2010).

17. Rot-fluoreszierende Proteine

Nach der Etablierung des GFP und seiner Derivate als wertvolle Werkzeuge der Biotechnologie können in den darauffolgenden Jahren mehrere GFP ähnliche Proteine in anderen Tierarten entdeckt werden. Insbesondere Arten der *Anthozoa*-Korallen sind heute als Produzenten mannigfaltiger Biolumineszenzmoleküle bekannt. Hierbei sind vor allem die von der Gattung *Discosoma* abstammenden *DsRed* Proteine von Bedeutung, als sie das natürliche Farbspektrum der Wildtypfluoreszenzen auf den roten Wellenlängenbereich erweitern (Matz et al., 1999).

In ersten Studien mit *DsRed* als Markerprotein für die Genexpression erkannte man allerdings einige unerwünschte Eigenschaften des roten Pro-

teins auf die Biologie des Zellzyklus. So kommt es durch die langsame Reifung des für die Fluoreszenz essentiellen Chromophors zu einem verzögert einsetzenden roten Leuchten und die tetramere Struktur verändert die Funktion und Lokalisation der zu untersuchenden Proteine nachteilig (Bevis & Glick, 2002). In nachfolgenden Entwicklungen gelingt es durch gezielte Mutationen in der Proteinstruktur des *DsRed*, diese Eigenschaften schrittweise zu verbessern. In diesem Zusammenhang beschrieben Bevis und Kollegen 2002 eine vom Wildtyp *DsRed* abstammende Mutante, als *DsRed4* bezeichnet, deren Chromophor schneller zur biologisch aktiven Form heranreift. Im gleichen Jahr präsentierten Campbell und Mitarbeiter eine neue monomere Variante des DsRed, das monomere Red fluorescent protein= *mRFP*, die die Funktion von Zellproteinen unbeeinflusst lässt (Campbell et al., 2002). Im Jahr 2004 optimieren Shaner und Kollegen das mittlerweile etablierte *mRFP* weiter zu dem 26 Kilodalton (KDa) *mCherry*, welches als Fluoreszenzprotein der nächsten Generation zur Verfügung steht (Shaner et al., 2004). In Abbildung 9 sind die Bereiche der Gensequenz des *DsRed* dargestellt, die zur Generierung des *mCherry* verändert wurden. Grau dargestellte Basen sind Wiederholungen, die in allen Varianten gleich vorkommen, spezifische Veränderungen für das *mRFP* erscheinen blau und für spezifische Abweichungen in *mCherry* lila. Dabei sind die Mutationen, die in Anlehnung an die Sequenz des GFP eingefügt wurden grün hervorgehoben (siehe Abbildung 10).

DsRed	MRSSKN-----VIKEFMRPKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNIVKLKVTGGPLP	55
mRFP1	MRSSKN-----VIKEFMRPKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNIVKLKVTGGPLP	55
mCherry	MVSKGRLENMAIIEKFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQIAKLKVTGGPLP	55
DsRed	FAWDILSPQFOYGSKVYVKKHPADIPDYKLSFPEGPKWERMNPFEDGGVVITQDSSLQD	115
mRFP1	FAWDILSPQFOYGSKVYVKKHPADIPDYKLSFPEGPKWERMNPFEDGGVVITQDSSLQD	115
mCherry	FAWDILSPQFOYGSKAYVKKHPADIPDYKLSFPEGPKWERMNPFEDGGVVITQDSSLQD	115
DsRed	GCFIYKVKFIVGNFPSDGFVMOKKTMGEASTERLYPRDGVLKGEIHKALKLKDGGHYLV	175
mRFP1	GCFIYKVKFIVGNFPSDGFVMOKKTMGEASTERLYPRDGVLKGEIHKALKLKDGGHYLV	175
mCherry	GCFIYKVKLRGTNFPDGFVMOKKTMGEASSERMYPEDGALKGEIKORLKLKDGGHYDA	175
DsRed	EFKSIYMAKKPVQLPGYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL-----	225
mRFP1	EFKSIYMAKKPVQLPGAYKIDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHSTGA-----	225
mCherry	EVKTIYKAKKPVQLPGAYNVNLIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGMDRLYK-	231

Abbildung 9: modifiziert nach Shaner 2004, Sequenzvergleich der verschiedenen Varianten von DsRed

Tabelle 2 verdeutlicht die Vorteile von *mCherry* im Vergleich zum Ausgangs-Wildtypmolekül *DsRed*, sowie seinen Nachfolgern *DsRed.4*, hier durch zwei Vertreter T1 und Dimer2 dargestellt, sowie dem *mRFP*. *mCherry* absorbiert eine deutlich höhere Energiemenge, wie bei der Betrachtung des Anregungsmaximums erkenntlich wird, so dass auch mehr Energie für die Emission verwendet werden kann, wie auch die Auswertung der Emissionsmaxima zeigt. Bei der Emission verschiebt sich die Wellenlänge des abgestrahlten Lichtes für *mCherry* deutlich in den stabileren roten Wellenlängenbereich. Zusammen mit den anderen optimierten Eigenschaften, wie der verkürzten Reifungszeit (siehe $t^{0.5}$ Reifung) und längerer Photostabilität (siehe $t^{0.5}$ Verblässen) stellt das *mCherry* derzeit die beste verfügbare Variante des *DsRed* für die Verwendung in biologisch aktiven Vorgängen dar.

Tabelle 2: modifiziert nach Shaner. Optische Eigenschaften der verschiedenen Varianten des DsRed im Vergleich, pKA=Säurekonstante

Fluoreszenzprotein	Anregungsmaximum(nm)	Emissionsmaximum(nm)	Anregungskoeffizient pro AS M ₁ cm ₁	Fluoreszenzquantenausbeute	Helligkeit des voll gereiften Proteins (%DsRed)	pKA	T _{0.5} Reifung	T _{0.5} Verblässen
DsRed	558	583	75,000	0.79	100	4.7	~10 h	ND
T1	555	584	38,000	0.51	33	4.8	<1 h	ND
Dimer2	552	579	69,000	0.69	80	4.9	~2 h	ND
mRFP1	584	607	50,000	0.25	21	4.5	<1 h	6.2
mHoneydew	487/504	537/562	17,000	0.12	3	<4.0	ND	5.9
mBanana	540	553	6,000	0.70	7	6.7	1 h	1.4
mOrange	548	562	71,000	0.69	83	6.5	2.5 h	6.4
tdTomato	554	581	69,000	0.69	80	4.7	1 h	6.4
tdTomato	554	581	138,000	0.69	160	4.7	1 h	70
mTangerine	568	585	38,000	0.30	19	5.7	ND	5.1
mStrawberry	574	596	90,000	0.29	44	<4.5	50 min	11
mCherry	587	610	72,000	0.22	27	<4.5	15 min	68

Neuere Untersuchungen bestätigen die verbesserten Eigenschaften des *mCherry* zur Markierung verschiedener Proteine im Zellzyklus (Tramier et al., 2006), aber auch für seinen Einsatz zur Detektion von Viren, wie Campbell und Kollegen 2007 durch Fusion des *mCherry* Proteins mit dem HIV-1 Virion demonstrieren (Campbell et al., 2007). Im Gegensatz zum GFP gibt es bisher noch keine Veröffentlichungen zu einer *in vivo* Nutzung mCherry markierter Viren, jedoch ist aufgrund der gut charakterisierten Eigenschaften die gute Eignung von *mCherry* Viren im Versuchstier anzunehmen.

18. Zielsetzung der Arbeit

Trotz der Ausrottung der Menschenpocken vor mehr als sechzig Jahren sind Orthopockenviren, wie das Kuhpockenvirus oder das Affenpockenvirus, mit zunehmender Häufigkeit Erreger zoonotischer Infektionskrankheiten. Besondere Aufmerksamkeit gilt hier einer möglichen neuen Anpassung dieser Viren an den Wirt Mensch. Die Grundlagen zur Virulenz wirtsspezifischer Orthopockenviren sind noch weitgehend unverstanden und die Aufklärung der Pathogenesemechanismen dieser Infektionen bleibt ein wichtiges Forschungsgebiet.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein neuartiges fluoreszenzmarkiertes Ektromelievirus entwickelt werden, dessen biologische Eigenschaften möglichst gut mit denen des originären Ektromelievirus übereinstimmen sollten. Im Idealfall sollte gewährleistet sein, dass die Ergebnisse aus Untersuchungen mit dem fluoreszenzmarkierten Ektromelievirus direkt auf bisherige Erkenntnisse aus dem Ektromelievirus-Maus-Infektionsmodell zu übertragen sind. Zunächst galt es, im Genom des Ektromelievirus eine geeignete Insertionsstelle für das selektierte Reportergen zu identifizieren, unter der Vorgabe, dass die gentechnologische Modifikation den ursprünglichen Phänotyp des Ektromelievirus nicht verändern sollte. Nach Konstruktion, Selektion und klonaler Isolierung entsprechender rekombinanter Viren sollten diese in Infektionsexperimenten im Vergleich zu Wildtyp-Ektromelievirus detailliert charakterisiert werden. Die zu erhebenden Daten zur Molekularbiologie der erwünschten rekombinanten Genexpression sowie zu Wirtszellspektrum und Vermehrungsfähigkeit der Viren in etablierten und primären Wirtszellen sollten schließlich die Identifizierung und Auswahl eines finalen Reportervirus ermöglichen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose, MP	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Roche, Mannheim
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Gel Red	Biotrend
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-SDS	9ml NaOH 0,22M+ 1ml SDS 10%
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phosphatase-Substrat CDP-Star	Roche Diagnostics, Penzberg
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics, Penzberg
Proteinase K	Merck, Darmstadt
„red blood cell lysing buffer“	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
SDS	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
TEMED	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Tris	Appli Chem
True Blue Peroxidas Reagent	KPL
Tween®-20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe

2. Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tabelle 4: Puffer, Lösungen und Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Blottingpuffer Westernblot	1x 100ml 200ml auf 1L mit	Tris-Glycin-Buffer Methanol Reinstwasser
„blocking solution“	1 x 5 % (w/v) 0,1 % (v/v)	TBS Magermilchpulver Tween®-20
LB-Medium *	1 % 0,5 % 1 %	Trypton Hefeextrakt NaCl in Aqua dest., autoklaviert
Natriumacetat-Lösung	3 M	Na-Acetat pH 6,3
PBS *	1,5 mM 0,8 mM 137 mM 3 mM	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl KCl pH 7,4
Proteinase K	1 mg/ml in 1,5 mM CaCl ₂	
SDS Lysepuffer, 1 x	62,5 mM 2 % (w/v) 10 % (v/v) 3,2 % (v/v) 0,01 % (w/v)	Tris-HCl SDS Glycerin β-Merkaptoethanol Bromphenolblau pH 6,8
SDS-PAGE-Laufpuffer, 10 x	19,2 M 5 M 10 % (w/v)	Glycin Tris SDS pH 8,9
TAE, 20 x	0,32 M 2,3 % (v/v) 25 mM	Tris Essigsäure EDTA pH 8,0
TEN, 10 x	100 mM 10 mM 1 mM	Tris EDTA NaCl pH 7,5
Tris	1 mM bis 1,5 M, ver- schiedene pH-Werte	
Tris-Glycin-Buffer	30,3g Tris 144g Glycin auf 1L mit Reinstwasser	
Waschpuffer	0,1 M 0,15 M 0,3 % [v/v]	Maleinsäure NaCl Tween 20 pH 7,5

* Nährbodenküche Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen , LMU München

3. Nährmedien und Zusätze

Tabelle 5: Nährmedien und Zusätze

Bezeichnung	Bezugsquelle
Acutase	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
DMEM („Dulbecco's Modified Eagle's Medium“)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
fötales Kälberserumalbumin (FKS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
HEPES	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
L-Glutamin (200 mM)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
Penizillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
RPMI 1640	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe
S.O.C. Medium	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Trypsin-EDTA	PAA Laboratoires GmbH, Cölbe

4. Nicht markierte Antikörper

Tabelle 6: Nicht markierte Antikörper

Name	Spezifität	Ursprung/ Klonalität	Anwendung Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Actin	Maus Anti Actin	Maus monoklonal	WB 1:2000	Sigma-Aldrich, St-Louis
RED	mCherry	Ratte monoklonal	WB 1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
Anti-VAVC Lister	VACV Lister Virionen	Kaninchen, polyklonal	IS 1:2000	Acris Antibodies, Herford

WB: Western Blot-Analyse; IS: Immunostaining

5. Markierte Antikörper

Tabelle 7: Markierte Antikörper

Name	Spezifität	Ursprung/ Klonalität	Markierung	Anwendung Verdünnung	Bezugsquelle
POD conjugated AffinePure Goat	Kaninchen IgG	Ziege polyklonal	Peroxidase	IS 1:5000	Dianova, Hamburg
Anti Mouse IgG	Maus, IgG	Ziege, polyklonal	Peroxidase	WB 1:10000	Sigma-Aldrich, St-Louis
Anti-CD11b	Maus IgG2b	Ratte	FITC	FACS	Biolegend, Eching
Isotyp-kontrolle	Ratte IgG2b	Ratte	FITC	FACS	Biolegend, Eching
Anti- CD3	Maus CD3	Hamster	PE	FACS	Biolegend, Eching
Isotyp-kontrolle	Hamster IgG	Hamster	PE	FACS	Biolegend, Eching

Anti Ly6C	Maus IgG2c	Ratte	Cy7	FACS	Biolegend, Eching
Isotyp-kontrolle	Ratte IgG2c	Ratte	Cy7	FACS	Biolegend, Eching

WB: Western Blot-Analyse; IS: Immunostaining; FACS: Durchflusszytometrie

6. Bakterienstämme

Alle im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten mit Bakterien wurden mit dem chemisch kompetenten *E. coli*-Stamm TOP10 NEB 10 beta competent high efficiency der Firma New England Biolabs durchgeführt.

7. Primer

In der nachfolgenden Tabelle sind die hier verwendeten Oligonukleotide inklusive ihrer Sequenzen, den dazugehörigen Hybridisierungstemperaturen (T_{hyb}) und dem spezifischen Verwendungszweck dargestellt.

Unterstrichene Sequenzabschnitte kennzeichnen die im Zuge von Klonierungsarbeiten angefügten Restriktionsschnittstellen für Enzyme.

Tabelle 8: Primer, ihre Sequenz, Hybridisierungstemperatur (T_{hyb}) und Verwendung

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Thyb	Verwendung
EVM064_for	AGT CAG <u>GAA TTC</u> CCT GGA ACG TAC GTC	60°C	forward-Primer zur Amplifikation von Flank1 von ECTV Moscow EVM064 mit EcoRI Restriktionsschnittstelle
EVM064_rev	AGT CAG <u>GCG CGC</u> CTT AGT TAT TAT CTA CAG GAA C	60°C	reverse-Primer zur Amplifikation von Flank1 von ECTV Moscow EVM064 mit AscI-Restriktionsschnittstelle
EVM063_for	TAG TCA <u>ACT GCA</u> GTC AAA CTC TAA TGA CCA CAT CT	60°C	forward-Primer zur Amplifikation von Flank2 von ECTV Moscow EVM063 mit PstI-Restriktionsschnittstelle
EVM063_rev	TAG TCA <u>AAG CTT</u> GTT CTT GAC GCA ACA AAT G	60°C	reverse-Primer zur Amplifikation von Flank2 von ECTV Moscow EVM064, mit HindIII-Restriktionsschnittstelle
ECTV-mCherry for	GGA GTT GGA TAA CTT TGA GAG GAC	57°C	forward-Primer zur Selektion rekombinanter mCherry Viren mittels Plaque-PCR
ECTV-mCherry rev	GGA ATA CAA GGT ACG ACG TAA CTG C	57°C	reverse-Primer zur Selektion rekombinanter mCherry Viren mittels Plaque-PCR

8. Plasmide

Alle Plasmide, die für die hier dargestellten Klonierungsarbeiten verwendet wurden, sind in der nächsten Tabelle mit Vermerk über ihre Herkunft, Zusammensetzung und Verwendungszweck zusammengestellt.

Tabelle 9: Plasmide, ihre Zusammensetzung und Herkunft

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herkunft
pNEB_193	–	NEB, Germany
pNEB_Fl.2	pNEB_193 in das über <i>Pst</i> I in <i>Hind</i> III die ECTV- Flank2 inseriert wurden	diese Arbeit
p_Fl.2_mCherry	pNEB_Fl.2 in das über <i>Sma</i> I das mCherry Gen inseriert wurde	diese Arbeit
pECTV_mCherry	P_Fl.2_mCherry in das über <i>Eco</i> RI und <i>Asc</i> I die ECTV-Flank1 inseriert wurde Vektorplasmid zur Herstellung von ECTV_mCherry	diese Arbeit

9. Viren

Tabelle 10: Viren

	Zusammensetzung	Herkunft
ECTV Mo-scow	Virulentes, klonales Isolat MOS-3-P2	R. Mark L. Buller St. Louis University, USA
ECTV_mCherry	Rekombinantes ECTV Moscow mit inserierter mCherry Gen-Expressionskassette im Zwischengenomlokus EVM063/EVM064	diese Arbeit

10. Zellkultur

10.1. Kultivierung permanenter Zellen

Sofern nicht anders vermerkt erfolgte die Kultivierung permanenter eukaryontischer Zelllinien im Brutschrank in einer 5% CO₂ Atmosphäre, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und 37 °C Temperatur. Dabei wurden die jeweiligen Kulturmedien mit 10% bzw. 5% fötalem Kälberserum (FKS) versetzt sowie 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Beurteilung der Zellen erfolgte täglich mit einem inversen Lichtmikroskop.

Tabelle 11: Zelllinien, ihre Herkunft und das entsprechend verwendete Kulturmedium

Zelllinie	Bezeichnung	Medium	Referenz
MA-104	Nierenepithelzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	DMEM	ATCC CRL-2378
MEF	Mausembryofibroblasten-Linie	RPMI	Harding et al. 2000 Mol Cell
MHS	Mauslungenmakrophagen-Linie	RPMI	Mbawuiké et al, 1989 Journal of Leukocyte Biology

10.2. Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen

10.2.1. Milzzellen

C57BL/6-Mäuse dienten der Gewinnung primärer Milzzellen. Dazu wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach Desinfektion wurde die Milz entnommen, in eine Petrischale mit PBS überführt und die Milz anschließend über Verreibung durch einen Falcon Filter der Porengröße 70 µm in ein 50 ml Falcon homogenisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Zur Lyse der im Zellpellet vorhandenen Erythrozyten wurde das Zellpellet mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer „Red blood lysing buffer“ resuspendiert, fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach der Zugabe von 7 ml PBS erneut für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieses Zellpellet wurde in 5 ml RPMI aufgenommen und zur Beseitigung etwaiger Zelltrümmer nochmals über einen Falcon Filter (70 µm) filtriert. Nach finaler Zentrifugation wurde das Pellet in einem ml RPMI resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Zur Kultivierung der wurden 6-Lochplatten mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen pro Vertiefung angelegt.

10.2.2. Myeloide Dendritische Zellen

Dazu wurden C57BL/6 Mäuse nach Narkotisierung mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet und Tibia und Femur nach Desinfektion unter der Sterilbank entnommen. Zur weiteren Keimreduktion wurden beide Knochen eine Minute in einer 70%-igen Ethanollösung inkubiert. Anschließend wurden das proximale und distale Ende der beiden Knochen entfernt und somit die Knochenmarkshöhle eröffnet. Mit Hilfe einer 25 G Kanüle wurden die in Markhöhle vorhandenen Zellen vorsichtig mit

angewärmten RPMI-Medium in ein 15 ml Falcon ausgespült. Die Zellsuspensionen von Femur und Tibia wurden vereinigt und 10 min bei 4 °C mit 1100 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml RPMI Medium resuspendiert und in eine Petrischale ausgebracht.

10.2.3. Differenzierung primärer Makrophagen

Dem Resuspensionsmedium wurde rekombinantes murines Zytokin GM-CSF („granulocyte macrophage colony stimulating factor“) in einer Konzentration 100 ng/ml zugegeben. Dieses Zytokin ermöglicht die Differenzierung der Makrophagenpopulationen aus den primären Knochenmarkszellen. Ein Tag nach Aussaat der primären Zellen wurden alle nicht adherenten aus Petrischale in ein 50 ml Falcon überführt, 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert und das Zellpellet erneut nach Resuspension in 10 ml RPMI Medium mit Stimulationsfaktor in einer Petrischale ausgesät. Anschließend wurde die Petrischale für sieben Tage bei 37°C und 5%-iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Am Tag sieben nach der Präparation wurden die in der Petrischale adherenten Zellen mit 5 ml Acutase abgelöst und die gesamte Zellsuspension für 10 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 3 ml RPMI aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und 8×10^5 Zellen pro ml in 6-Lochplatten mit Stimulationsfaktor ausgesät.

10.2.4. Kultivierung und Passagierung von Zellkulturen

Zum Passagieren der einzelnen Zelllinien wurde das Medium abgenommen und der Zellmonolayer mit angewärmtem Trypsin (= 5ml/ T175 Zellkulturflasche) einmal gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 5 ml Trypsin pro T175 Zellkulturflasche bei 37°C. Die abgelösten Zellen wurden in einem bestimmten Volumen vorgewärmtem Medium resuspendiert und dann je nach gewünschtem Teilungsverhältnis im entsprechenden Volumen auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

10.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur Kryokonservierung wurde eine T175-Zellkulturflasche mit Trypsin wie oben beschrieben abgelöst und die Zellen bei 1200 rpm 5 min abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde dann in je 1 ml einer speziellen Einfrierlösung aus 90% v/v FCS und 10% v/v DMSO resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Im nächsten Schritt erfolgte ein rasches Ab-

kühlen des Kryoröhrchen auf -80°C für mindestens 2 Stunden, gefolgt von der Lagerung im Stickstoff-Lagertank bei -180°C in der Gasphase.

Das Auftauen der im Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte durch rasches Erwärmen im Wasserbad bei 37°C und anschließendes Lösen in Kulturmedium. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und dann in eine T175 bzw. T75 Flasche, entsprechende der Zellzahl, verteilt.

10.4. Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer „*improved Neubauer*“-Zählkammer der Firma Assistent und Berechnung nach der Formel:

$$X/1000 \times \text{Verdünnungsfaktor pro ml}$$

10.5. Infektion von Zellen

Die Kultivierung infizierter Zellen erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, in Medium mit 2% FKS sowie 1% Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden entweder in Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten ausgesät und in der Regel bei 90 %-100 % Konfluenz des Zellrasens infiziert. Nach Möglichkeit waren die für die Infektion verwendeten Zellkulturen nicht älter als 24 bis 48 h.

Vor der Infektion erfolgte eine dreimalige Behandlung der Virussuspensionen mit Ultraschall im Eiswasserbad für jeweils 60 s bei maximaler Leistung des Ultraschallgerätes Sonoplus. Dazwischen wurden das Virusmaterial 10 s kräftig mit dem Vortexgerät durchmischt. Zur Infektion wurde das Kultivierungsmedium von den Zellen entfernt und Virus in der gewünschten Konzentration auf die Zellen gegeben. Dabei erfolgte die Inokulation des Virus in einem reduzierten Volumen von Kulturmedium (z.B. 5 ml/T175). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 60-90 min. In dieser Zeit wurden die Zellkulturflaschen alle 10 min geschwenkt, um eine fortwährende Benetzung des Zellrasens und eine gleichmäßige Verteilung des Virus zu gewährleisten. Nach Adsorption des Virus wurde das Kultivierungsmedium aufgefüllt und bei 37 °C im Brutschrank 2-3 Tage inkubiert. Die durch Virusinfektion bedingten Veränderungen der Zellmorphologie

(Zytopathischer Effekt, CpE) wurden täglich mit Hilfe eines Lichtmikroskops begutachtet und die Zellen bei Erreichen eines 100 %igen CpE bei -20 °C eingefroren.

11. Gewinnung von Virusmaterial

11.1. Virusmaterial für Lagerung und in vitro Experimente

Zur Herstellung von Virusmaterial für Lagerung und in vitro Gebrauch wurden Zellkulturen mit fünf infektiösen Einheiten Virus pro Zelle (*multiplicity of infection*, MOI von 5) nach dem Basisprotokoll infiziert und bei 100 % CpE durch Gefrieretauen geerntet. Im nächsten Schritt diente eine Zentrifugation bei 16.000 rpm für 90 min zur Einengung des Virusmaterials. Das erhaltene Pellet wurde in Tris-HCL Puffer (1 mMol, pH 9) resuspendiert, und dreimal gefriergetaut. Nach Bestimmung der Infektiosität durch Titration (s.11.2) erfolgte die Lagerung des aliquotierten Virusmaterials bei -80°C.

11.2. Bestimmung der Infektiosität virushaltiger Suspensionen

Das Virusmaterial wurde hierfür in Verdünnungsstufen auf Zellkultur ausgebracht und anschließend wurden die Herde infizierter Zellen im Zellrasen mit einer Virus-spezifischen Immunfärbung sichtbar gemacht und ausgezählt.

Die serielle Verdünnung des Virus erfolgte über acht log₁₀-Stufen (10^{-1} bis 10^{-8}) in Kulturmedium und 1 ml Aliquots der Verdünnungsreihe wurden im Doppelansatz auf die Zellrasen von 6-Loch-Zellkulturplatten gegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde das Inokulat abgenommen und frisches Kulturmedium zugegeben. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Fixierung der Zellen mit eiskaltem Methanol/Aceton-Gemisch (1/1) für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Die fixierten Zellen wurden anschließend luftgetrocknet und dann mit 3% FCS in PBS (PBS 3%) für 60 min bei RT geblockt. Danach erfolgte die Immunfärbung mit Hilfe spezifischer Antikörperreagenzien. Zuerst wurde ein spezifisch gegen Vacciniavirus-Proteine gerichtetes, polyklonales Kaninchenserum (α Vacc) in der Verdünnung 1:2000 in PBS 3% auf die Zellkulturplat-

ten gegeben und für 60 min unter Schwenken bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift von je 5 min mit PBS. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase gekoppeltes, polyklonales Ziegenserum (anti-rabbit IgG) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS 3% für 45 min unter Schwenken bei RT verwendet. Nach erneutem Waschen der Platten mit PBS erfolgte die Zugabe des Färbereagens True-Blue (0,5 ml pro Zellkulturloch), das bis zur Entwicklung einer deutlichen Blaufärbung auf den Zellen belassen wurde (ca. 5 min). Die sichtbaren Infektionsherde (Plaques) wurden unter lichtmikroskopischer Kontrolle ausgezählt und zur Bestimmung des infektiösen Titers nach Mittelwertbildung der Doppelansätze mit den Verdünnungsstufen verrechnet. Die Angabe der Infektiosität einer Virussuspension erfolgte in Plaque bildenden Einheiten (*plaque forming units*, PFU) per ml.

11.3. Herstellung rekombinanter Viren

Die Generierung rekombinanter Ektromelieviren erfolgte über den Mechanismus der homologen Rekombination nach Transfektion von Vektorplasmid-DNA und unter Verwendung eines biologisch und genetisch hervorragend charakterisierten, klonierten Isolats des Ektromelievirus Stamm Moskau (ECTV MOS-3-P2). Dabei erfolgte die Selektion der rekombinanten Viren durch Sichtung der virusinfizierten Zellkulturen auf rote Fluoreszenz unter Anregung durch Licht der Wellenlänge 610 nm.

11.4. Transfektion virusinfizierter Zellen

MA-104 Zellen wurden in einer 6-Loch-Zellkulturplatte bei 80% Konfluenz des Zellrasens mit einer MOI von 0,05 Ektromelievirus Stamm Moskau infiziert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Parallel wurden 2 µg Plasmid-DNA mit 3 µl Transfektionsreagenz (X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent, Fa. Roche) nach Protokoll des Herstellers versetzt und nach einer Inkubation von 25 min bei RT tröpfchenweise in das Medium einer Vertiefung der infizierten 6-Loch-Platte gegeben. Anschließend erfolgte eine 48-stündige Bebrütung der transfizierten und infizierten Kulturen bei 37 °C. Danach wurde das Virusmaterial durch Abschaben der Zellen samt Medium geerntet und nach dreimaligem Gefriertauen bei -20 °C gelagert.

11.5. Klonale Isolierung rekombinanter Viren in der Zellkulturpassage

Das aus dem Transfektions-/Infektions-Experiment gewonnene Virusmaterial diente zur Infektion von MA-104-Zellrasen in 6-Loch-Platten. Dabei wurden log₁₀-Verdünnungen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) des Virus ausgebracht und nach 48 h Inkubation wurden die Zellkulturen auf Ektromelivirusherpesplaques gesichtet. Unter Sichtkontrolle im Fluoreszenzmikroskop wurden rot leuchtende Infektionsherde identifiziert, auf der Unterseite der Zellkulturplatte markiert und anschließend wurden virusinfizierte Zellen dieser Plaques mit der Eppendorfpipette in einem Volumen von 30 µl Medium gepickt. Der so gewonnene Plauepick wurde in einem Volumen von 500 µl Zellkulturmedium gelöst, dreimal gefriergetaut und dreimal je 60 s mit Ultraschall im Eiswasserbad behandelt, um wieder in serieller Verdünnung (10^{-1} bis 10^{-4}) auf 80% konfluente Monolayer von MA-104 Zellen in 6-Loch-Platten ausgebracht zu werden. Diese Prozedur der Plauepassage wurde bis zum Erhalt von genetisch einheitlichen, klonalen Isolaten der rekombinanten Viren wiederholt. Ab der vierten Plauepassage erfolgte zur genetischen Kontrolle der selektierten Viren eine gleichzeitige Kontrolle der Virus-DNA mittels PCR. Dabei fand zunächst die Extraktion der viralen DNA aus infizierten Zellen von selektierten 6-Lochkulturen der Plauepassage statt, dann die PCR unter zusätzlicher Verwendung von Kontroll-DNA aus nicht-rekombinanten Virus und Vektorplasmid (s.14.13). Anschließend erfolgte die vergleichende Auswertung der PCR nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1 %igen Agarosegel und Detektion bzw. Dokumentation unter UV-Licht.

12. Untersuchung der Vermehrungsfähigkeit von Ektromelivirus

12.1. Mehrschritt-Wachstumskurve

Die Mehrschritt-Wachstumskurve testet die Fähigkeit eines Virus, sich in einen Zellmonolayer auszubreiten, d.h. das Potential eines Virus erste Zellen zu infizieren, sich dort zu vermehren und wieder neue Zellen zu befallen. Diese Untersuchung ermöglicht eine Aussage über die Permissivität

von Zellen bzw. Geweben für die Replikation bestimmter Viren und erlaubt eine vergleichende Charakterisierung der Wachstumskinetik in Zellkultur.

Dazu wurden verschiedene Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten, mit Virus in einer MOI von 0.05 infiziert. Nach 0, 12, 24, 48 und 72 h p.i. wurden die Zellen mit einem Zellspatel gelöst und mit dem gesamten Überstand in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach dreimaligem Gefriertauen erfolgte die Lagerung der Proben bis zur Bestimmung des Virusgehaltes erfolgte -80 °C.

13. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

13.1. Kultivierung von kompetenten Bakterien

Kompetente Bakterien wurden entweder über Nacht in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten kultiviert. Dabei wurde Ampicillin in einer Endkonzentration 100 ng/ml zur antibiotischen Selektion eingesetzt. Flüssigkulturen wurden in Schüttelinkubatoren bei 37 °C und die Platten im Brutschrank bei 37 °C bebrütet.

13.2. Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation diente dazu die Plasmid-DNA in die Bakterienzelle einzuschleusen und so zu amplifizieren. Dies erfolgte mit Hilfe der Hitzeschockmethode. Dazu wurde ein Aliquot von 50 µl kompetenten Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und 1-10 ng der Plasmid-DNA bzw. 10 µl des zu testenden Ligationsansatzes hinzupipetiert. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock des Bakterien-Plasmid-Gemisches für 90 s bei 42 °C, so dass sich Poren in der Bakterienwand bilden, durch die die angelagerte Plasmid-DNA in die Zelle gelangt. Dann folgte ein Abkühlen des Gemisches für 2 min auf Eis. Nach Zugabe des 10-fachen Volumens an SOC-Medium wurde das Reaktionsgefäß für 60 min bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) vorinkubiert und anschließend die Bakterien-suspension nach Konzentration des Volumens auf ampicillinhaltigen LB Agarplatten ausgebracht, um über Nacht bei 37 °C zu inkubieren.

13.3. Animpfen von Flüssigkulturen zur Minipräparation von Plasmid-DNA

Dieses Verfahren dient der weiteren Vermehrung, der nach Transformation kultivierten Bakterien in Flüssigmedium unter antibiotischer Selektion.

Dazu wurden mit Hilfe steriler Pipettenspitzen von der mit Bakterien beimpften LB Agarplatte einzelne mittelgroße Kolonien gepickt und in 3 ml LB Medium mit Ampicillin für mindestens 12 h bei 37 °C in Schüttelinkubator (1000 rpm) kultiviert. Danach erfolgte für die Isolierung der Plasmid-DNA die Ernte der Bakterien durch Zentrifugation (5 min, 11000 rpm) der Minikulturen in Eppendorfreaktionsgefäßen (s.14.1) bzw. die Weitervermehrung, wie unten beschrieben.

13.4. Animpfen von Flüssigkulturen zur Maxipräparation von Plasmid-DNA

Der nächste Schritt zur Vervielfältigung Plasmid-tragender Bakterien ist die Maxiflüssigkultur. Dazu wurde ein 1 ml-Volumen der oben beschriebenen Minikultur in einen 500 ml fassenden Glaskolben überführt, das Volumen des LB-Ampicillin Mediums auf 100 ml aufgefüllt und für mindestens 12 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Ernte der Bakterien durch Zentrifugation (15 min, 4500 rpm) erfolgte die Präparation der Plasmid-DNA unter Verwendung kommerziell erhältlicher Kits (Quiagen, Plasmid Maxi) Kit nach Herstellerangaben.

14. DNA- Methoden

Soweit nicht anders erläutert, erfolgte die Aufreinigung und Fällung von DNA mit Hilfe der Phenol/Chloroform-Extraktion.

14.1. Präparation von Plasmid DNA

Dazu wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 60 s bei 11.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienzellpellet in 100 µl TGE mit 2 mg/ml Lysozym resuspendiert. Die Zugabe eines Gemisches von 200 µl NaOH–SDS, gefolgt von einer 5 min Inkubation auf Eis, erlaubte die Bakterien-

zellwände aufzubrechen. Gleichzeitig bauten die im Puffer enthaltenen RNAsen die nach Zellwandlyse freiwerdende bakterielle RNA ab. Dann wurden dem Gemisch 150 µl Kaliumacetat zugegeben, um so die chromosomale DNA und Zellwandbestandteile der zerstörten Bakterienzellen auszufällen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 11000 rpm wurde der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand für die Durchführung der Phenol/Chloroform-Extraktion in ein frisches Reaktionsgefäß überführt

14.2. Präparation von Komplett-DNA aus virusinfizierten Zellen

Dazu wurden die Zellen einer 6-Loch-Platte mit einer MOI von 10 infiziert und für 24-48 h bei 37 °C inkubiert. Alle Zellen einer 6-Loch-Kultur wurden dann mit einem Zellschaber in etwa 400 µl Medium abgelöst, inklusive Medium in ein 1,8 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 50 µl 10x TEN Puffer dreimal gefriergetaut und jeweils durch 5 s Behandlung auf dem Vortexer gemischt. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K und 23 µl SDS 20% und erneutem Mischen durch End-zu-End-Rotation des Reaktionsgefäßes erfolgte eine Inkubation der Suspension für 2 h bei 56°C, um dann mittels Phenol-Chloroform-Extraktion weiterverarbeitet zu werden.

14.3. Präparation zytoplasmatischer DNA

Diese Methode zielt darauf, bevorzugt die in den Zellen vorhandene pokkenvirale DNA zu isolieren und von der zellulären DNA im Zellkern zu trennen. Zur Präparation zytoplasmatischer Virus-DNA wurden alle Zellen einer virusinfizierten 6-Loch-Kultur mit einem Zellschaber in etwa 800 µl Medium abgelöst, inklusive Medium in ein 1,8 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (10 min, 1000 rpm) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 500 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris-Cl, 8 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,5 % NP-40, pH 7.5) gelöst, gut gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Mischen erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 4 ° und 10.000 rpm zur Entfernung unlöslicher Zellbestandteile und Überführung des DNA-haltigen Überstandes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß für die Durchführung der Phenol/Chloroform-Extraktion.

14.4. Phenol/Chloroform Extraktion

Die Trennung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren durch die Phenol/Chloroform-Extraktion beruht auf dem Prinzip, dass diese Stoffe in einer zweiphasigen Emulsion unterschiedliche Löslichkeit besitzen. Dabei sammeln sich Lipide und Proteine vorwiegend in der unteren Phase sowie an der Phasengrenze, wohingegen DNA und RNA vornehmlich in der oberen (wässrigen) Phase zu finden sind. Die Entnahme der wässrigen Phase ermöglicht eine Fällung der DNA durch Zugabe von Ethanol.

Der Probe mit der zu isolierenden DNA im 1,8 ml Reaktionsgefäß (s. 14.2) wurden 500 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) zugegeben, die Suspension gut durchmischt durch mehrmalige Behandlung mit dem Vortexer und dann für 5 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die klare wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einmaliger oder zweimaliger Wiederholung dieses Extraktionsschrittes erfolgte die Zugabe von 50 µl Natriumacetat (3 M) und 1000 µl eiskaltem Ethanol (100 %). Die Fällung der DNA erfolgte durch Inkubation bei -80 °C für 2 h gefolgt von einer 45 min Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4° C. Das so erhaltenene DNA-Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen, durch 15 min Lufttrocknung von Ethanolresten befreit und in 30 µl TE Puffer aufgenommen.

14.5. Qualitätskontrolle isolierter DNA

Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der DNA wurde eine spektralphotometrische Messung mit dem Gerät Nanodrop durchgeführt. Dabei wurde 1 µl der in TE Puffer gelösten DNA auf die Messvorrichtung des Gerätes gegeben und dann bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. als Referenz gemessen. Die DNA weist ihre höchste Adsorption bei 260 nm auf, wohingegen aromatische Aminosäuren das Messoptimum bei 280 nm haben. Nach den Messungen mit beiden Wellenlängen wurde der Quotient aus beiden Werten gebildet und mit Hilfe dieses Wertes kann dann eine Aussage über die Reinheit der DNA gemacht werden, Werte kleiner 1,8 weisen auf eine Kontamination mit Proteinen hin und Werte größer 2 auf das Vorhandensein von RNA.

Des Weiteren erfolgte zusätzlich eine Abschätzung der Größe, Reinheit und Menge der Proben-DNA durch eine gelelektrophoretische Auftrennung im Agarosegel unter Verwendung von DNA-Längenstandards.

14.6. Restriktionsanalyse

Für das Schneiden von Plasmiden und PCR-Produkten im Zuge der Klonierungen wurden Restriktionsenzyme der Klasse II verwendet, die gezielt an einer bestimmten Stelle im Genom über eine spezifische Erkennungssequenz schneiden. Dies geschieht ohne zusätzliche Kofaktoren und ohne weitere Modifikation. Abhängig von der eingesetzten Menge an Nukleinsäure und der jeweils verwendeten Restriktionsendonuklease erfolgte die Inkubation der DNA in einem Gesamtvolumen von 20, 50, 100 oder 200 µl.

Als Beispiel ist im Folgenden das Standardprotokoll für einen 20 µl Ansatz angegeben:

10 × Restriktionspuffer	2,0 µl	
10 × BSA	2,0 µl	(falls für Enzym notwendig)
DNA	200,0 ng	
1. Restriktionsendonuklease	0,5 - 1,0 µl	
2. Restriktionsendonuklease	0,5 - 1,0 µl	
Aqua dest.	ad 20,0 µl	

14.7. Trennung von DNA Fragmenten mit Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Elektrophorese bezeichnet eine Methode zur Auftrennung von Molekülen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größen und Ladungen.

Negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld des Gels zur positiv geladenen Anode. Weiter bestimmt die Molekülgröße die Wanderungsgeschwindigkeit, das heißt abhängig von der Größe der Poren des Agarosegels können kleinere Moleküle schneller wandern als größere. Dementsprechend kann man das Gel durch Varianz der Porengröße an die zu detektierenden Molekülgrößen anpassen. Die für Gelelektrophorese benötigte Agarose wird in TAE Puffer gelöst und bis zum Kochen in der Mikro-

welle erhitzt. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente variiert die Konzentration der Agarose der Gele von 0,5-1,2 %. Zum Sichtbarmachen der DNA-Fragmente im Gel wurde eine spezielle Färbelösung, „Gel Red“ zugesetzt. Dieser Farbstoff lagert sich in die Helixstruktur der DNA ein und wird sichtbar durch Anregung im UV Licht.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen an Ladepuffer versetzt, um ein Verbleib der Proben in den Geltaschen zu gewährleisten und die Lauffront sichtbar zu machen. Um später die Größen der DNA-Fragmente genau abschätzen zu können, wurden zusätzlich kommerziell verfügbare DNA-Größenstandards (z.B. 1-kb–DNA Ladder) aufgetragen. Zum Auftrennen der Probengemische wurde zunächst eine Spannung von 1 V/cm Gel angelegt, um die Proben langsam aus den Taschen ins Gel einlaufen zu lassen, anschließend erfolgte die Erhöhung der Spannung auf 5 V/cm Gel. Nach Erreichen einer ausreichenden Auftrennung wurden die DNA-Banden mit UV-Licht der Wellenlänge 254nm sichtbar gemacht und mittels Kamera digital dokumentiert.

14.8. Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel

Dazu wurden nach Visualisierung unter UV-Licht die selektierten DNA-Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die entsprechende DNA aus dem Agarose-Klötzchen anschließend mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Fa. QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert.

14.9. Isolierung von DNA aus Restriktions- bzw. Ligationsansätzen

Dazu wurde das Volumen eines vorliegenden Ansatzes mit TE Puffer auf 500 µl aufgefüllt und dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1/1) versetzt. Danach erfolgte entsprechend des oben angegebenen Protokolls die Extraktion der DNA mit Phenol /Chloroform Methode (s.14.4).

14.10. Ligationsansatz

Ligationsreaktionen dienen zur kovalenten Verknüpfung von Fragmenten doppelsträngiger DNA unter Verwendung des Enzyms DNA-Ligase des

Bakteriophagen T4 und einem entsprechenden 10x Ligasepuffer. Dieses Verfahren wurde zur Klonierung viraler bzw. rekombinanter DNA (Insert) in Plasmid-Vektoren (Vektor), welche in *E. coli* amplifiziert werden können. Nachfolgend ist ein Standardligationsansatz dargestellt:

Vektor-DNA	X μ l
Insert-DNA	Y μ l
10 x Ligationspuffer	2,0 μ l
10 mM ATP	0,5 μ l
T4 DNA-Ligase	1,5 μ l
Aqua dest.	ad 20,0 μ l

In der Regel führte dabei ein Einsatz von Insert-DNA in 5 bis 10-fachem Überschuss zur Vektor DNA zu optimalen Ergebnissen der Ligationsreaktion. Die Konzentrationen der DNA-Lösungen von Insert und Vektor wurden nach Mini-Gel-Elektrophorese und UV-Dokumentation abgeschätzt und dementsprechend die in der Ligationsreaktion einzusetzenden Volumina bestimmt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 4 bis 12 h bei 16 °C („sticky end“-Ligationen) oder über Nacht bei einem Temperaturgradienten von 0 °C bis RT. Im nächsten Schritt wurde der gesamte Ligationsansatz, wie oben beschrieben, in kompetente Bakterien transformiert.

14.11. Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierungsreaktion soll die Religation von linearsierter DNA des Plasmidvektors verhindern. Die Verknüpfung der einzelnen Nukleotide der DNA erfolgt über die Spaltung und Bindung der Phosphatgruppen eines Nukleotides. Durch die Abspaltung der Phosphatgruppe wird das Risiko vermindert, dass es zu einer solchen Ligation kommt und das Plasmid in der linearisierten Form erhalten bleibt.

Zur Dephosphorylierung wurde die Antarctic Phosphatase der Firma NEB entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

14.12. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der PCR werden bestimmte DNA Abschnitte *in vitro* mit Hilfe des Enzyms Taq-DNA-Polymerase vervielfältigt. Die Polymerase ergänzt dabei einzelsträngig vorliegende DNA komplementär mit Hilfe spezifischer Pri-

mer. Primer sind kurze Oligonukleotide, die Sequenz-spezifisch den Anfang eines zu ergänzenden DNA-Stranges bilden und ein freies 3' OH-Ende bieten, an dem die Polymerase anlagert und mit der Synthese der komplementären DNA-Sequenz beginnt.

Im ersten Schritt muss die doppelsträngige DNA durch Hitzeeinwirkung von 95 °C in zwei einzelne Stränge aufgetrennt werden. Dann können die Primer entsprechend ihrer komplementären Sequenz anlagern. Dies erfolgt bei der für die jeweiligen Primer spezifischen Annealingtemperatur, die zwischen 50-65 °C liegt. Die Elongation, das heißt die Synthese des neuen DNA Stranges durch die thermostabile DNA-Polymerase, findet bei 72°C statt. Diese lagert komplementär zu der Basenfolge der Einzelstrang-DNA die Nukleotide an, wodurch dann wieder ein DNA-Doppelstrang entsteht. Die Einzelschritte Denaturierung, Annealing und die Elongation werden dann innerhalb einer PCR in bis zu 35 Zyklen wiederholt und dabei die DNA der Zielensequenz in großer Menge vervielfältigt.

Die verschiedenen Schritte und Zyklen der PCR werden automatisiert in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt. Für eine Standard-PCR mit Taq Polymerase wurde folgender Ansatz und Temperaturverlauf verwendet:

Aqua dest.	Ad 50µl			
10 × PCR-Puffer mit Mg ²⁺	6µl	95°C	10 min	
10mM dNTPs	6µl	95°C	1 min	} 35 Zyklen
5'-Primer	2,5µl	Y°C	0,5 min	
3'-Primer	2,5µl	72°C	1 min	
Template-DNA	5µl	72°C	10 min	
DNA-Polymerase	1µl	4°C	∞	
	Σ 50 µl			

Für die PCR vermittelte Synthese von DNA-Fragmenten, die für die Herstellung von rekombinanten Viren verwendet wurden, wurde die sogenannte Pfx-Polymerase verwendet. Diese verfügt über eine Art „Korrekturlesefunktion“, die eventuell falsch synthetisierte Bereiche korrigieren kann und so die Fehlerrate möglichst gering hält.

Dafür wurde folgendes Standardprotokoll verwendet:

Aqua dest.	Ad 50µl			
10 × PCR-Puffer mit Mg ²⁺	5µl	94°C	5 min	
10mM dNTPs	7µl	94°C	15 s	} 30 Zyklen
5'-Primer	2,5µl	Y°C	10 s	
3'-Primer	2,5µl	68°C	1 min	
Template-DNA	3µl	68°C	5 min	
Pfx-Polymerase	1µl	4°C	∞	
	Σ 50 µl			

14.13. PCR zur Untersuchung viraler DNA

Zur regelmäßigen Untersuchung viraler DNA im Rahmen der Plaque-Passage rekombinanter Ektromelieviren wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Aqua dest.	Ad 50µl			
10 × PCR-Puffer mit Mg ²⁺	6µl	95°C	10 min	
10mM dNTPs	6µl	95°C	1 min	} 35 Zyklen
5'-Primer	2,5µl	Y°C	0,5 min	
3'-Primer	2,5µl	72°C	1 min	
Template-DNA	3µl	72°C	10 min	
Pfx-Polymerase	1µl	4°C	∞	
	Σ 50 µl			

Dazu wurden die ECTVmCherry Primerpaare ECTV_mCherry verwendet und das Standardtemperaturprotoll unter Einsatz der Primer-spezifischen Annealingtemperaturen.

14.14. Sequenzanalyse klonierter DNA

Die Sequenzanalyse zur Charakterisierung der Vektorplasmid-DNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg Plasmid-DNA getrocknet und zusammen mit den zur Sequenzierung zu verwendenden Oligonukleotid-Primern an MWG übersandt. Im Anschluss erfolgte die Auswertung mit Hilfe der Software Lasergene SeqBuilder.

15. Proteinbiochemische Methoden

15.1. Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten Zellen

Die Ernte infizierter Zellen erfolgte abhängig von der Größe ihres Kultivierungsgefäßes entweder mit Hilfe eines Zellschabers oder bei kleineren Gefäßen mit einer Eppendorfpipette. Dazu wurde zunächst der Mediumüberstand abgenommen und der Zellmonolayer einmal mit kaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte die Ernte der Zellen mit Zelllysispuffer und Überführung des Lysates in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß. Das Gemisch wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 13.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80 °C gelagert.

15.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung erfolgte mit dem Micro BCA™ Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific entsprechend der Herstellervorgaben.

15.3. Western Blot

Diese immunologische Methode zur spezifischen Untersuchung und Detektion von Proteinen gliedert sich in drei Arbeitsschritte. Am Anfang steht die Größen-abhängige Auftrennung der Polypeptide eines Proteingemisches mit Hilfe der Gelelektrophorese, gefolgt von dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran und am Ende der Nachweis einzelner Proteinbanden per Immundetektion. Im Folgenden sind die drei Schritte näher erläutert.

15.4. Herstellung von SDS-PAGE-Gelen (Größe 135x115x1,5mm)

Entsprechend der folgenden Tabelle wurden die verschiedenen Komponenten zur Herstellung eines 10% Trenngels und 5% Sammelgel miteinander vermischt und das Gel in der entsprechenden Gelapparatur gegossen.

Tabelle 12: Herstellung von SDS-PAGE-Gelen

	TG					SG
	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	5 %
H ₂ O	5,3	4,6	4,0	3,3	2,3	2,1
30 % Acryl-Bisacryl-Mix	2,0	2,7	3,3	4,0	5,0	0,5
1,5 M Tris (pH 8,8 ^{TG} /6,8 ^{SG})	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,38
10 % SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03
10 % APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03
TEMED	0,008	0,006	0,004	0,004	0,004	0,003
Σ	10,0 ml					3,0ml

Das gegossene Gel wurde in der vertikalen Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Laufkammern wurden mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Im nächsten Schritt wurden der Gelkamm vorsichtig senkrecht aus dem Gel gezogen und die Geltaschen mit einer Spritze und Kanüle durchspült, um Gelreste sorgfältig zu entfernen. Dann wurden je 5 µl Volumina der Proben mit einer Eppendorfpipette in die Taschen gefüllt und zusätzlich ein Proteingrößenstandard aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei gleichbleibender Spannung von 80-100V und einer Stromstärke von maximal 400mA für eine Laufzeit von etwa 2 h entsprechend bis die blaue Lauffront des Probenpuffers die untere Gelkante erreicht hatte.

15.4.1. Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Darunter versteht man eine analytische Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen im elektrischen Feld. Die SDS PAGE wird spezifisch zum Trennen von Proteingemischen verwendet. Dies erfolgt, wie auch schon die Agarosegelelektrophorese auf der Basis unterschiedlicher elektrischer Ladung und Molekülgröße der Proteine.

Dazu inkubiert man das Probengemisch mit dem anionischen Detergens SDS bei 95 °C. Dadurch werden die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Bindungen innerhalb des Proteins nicht mehr aufrechterhalten. Die endgültige Denaturierung erfolgt durch Zugabe des reduzierenden Thiols β-Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken spaltet. Das stark negativ geladene SDS überträgt seine Eigenladung auf das linearisierte denatu-

rierte Protein. So werden die Sekundärstrukturen und Tertiärstrukturen durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und SDS kann mit seinem aliphatischen Rest an den hydrophoben Bereich des Proteins binden. Alle Proteine erhalten eine negative Ladung und wandern entsprechend im elektrischen Feld von negativ zu positiv.

In diesen Experimenten wurde die diskontinuierliche SDS Page nach Lämmli (Laemmli, 1970) mit entsprechendem Puffersystem von Fling und Gregerson (Fling and Gregerson, 1986) verwendet. Bei der diskontinuierlichen SDS Page wandern die ins Gel aufgetragenen Proteinproben zunächst in ein niedriger prozentiges Sammelgel und werden dort zu einer scharfen Bande fokussiert bevor sie nahezu gleichzeitig ins Trenngel wandern. Dies führt im Trenngel zu einer guten Auftrennung und hohen Schärfe was die Effizienz des anschließenden Membrantransfers verstärkt.

15.4.2. Membrantransfer

Im nächsten Schritt werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen, damit auf der mechanisch stabileren Membran die Immunodetektion der nun für verschiedenste Reagenzien zugänglichen Proteine erfolgen kann.

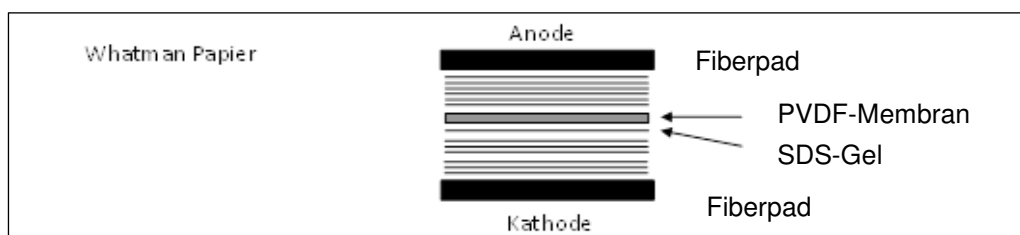
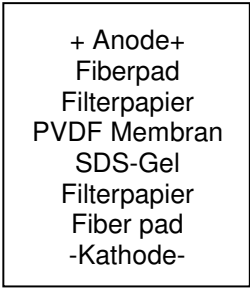


Abbildung 10: Membrantransfer

Die Übertragung der Proteine erfolgte nach dem nassen Verfahren mit dem sogenannten Tankblot. Dazu wurden zunächst die Filterpapiere zusammen mit den Schaumstoffkissen (fiber pad) und der auf die Größe des Gels zurechtgeschnittenen PVDF Membran vollständig mit 1 x Transferpuffer benetzt. Dann wurde die Blottingapparatur wie folgt zusammengebaut:



+ Anode+
Fiberpad
Filterpapier
PVDF Membran
SDS-Gel
Filterpapier
Fiber pad
-Kathode-

Hierbei ist zu beachten, dass alle Komponenten ausreichend mit 1x Transferpuffer durchtränkt sein müssen. Der Einschluss von Luftblasen im Blot wird durch Ausrollen jeder Filterpapierschicht mit einer Glaspipette vermieden. Der Transfer erfolgte bei 4 °C in der Blot-Apparatur (Minitrans-Blot Electrophoretic Transfer Cell) für eine Stunde bei 100 V. Zur Vermeidung von Wärmeentwicklung während des elektrophoretischen Transfers wurde ein Kühlakku in die Apparatur eingehängt und regelmäßig ausgetauscht.

15.4.3. Immunodetektion von Proteinen

Nach der Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte zunächst ein Inkubationsschritt, um unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Dazu wurde die Membran, nach Waschen mit Pufferlösung für 3 x 15 min, in TBS-Puffer mit 5 % Milchpulver für mindestens 30 min unter Schwenken inkubiert. Dann erfolgte nach erneutem Waschen mit Puffer der spezifische Nachweis von Polypeptiden mittels indirekter Antikörpermarkierung in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem antigenspezifischen unmarkierten Antikörper auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-0,1 % Tween-20 bzw. mit TBS-0,1 % Tween-20 (TBST) wurde der zweite speziesspezifische und mit Peroxidase markierte Antikörper in 5 % Milchpulver in TBS zugegeben und die Membran für 60 min bei RT inkubiert.

Danach erfolgte wieder ein dreimaliger Waschschrift und anschließend wurde die Substratlösung (Amersham ECL Plus™, Fa. GE Healthcare, verwendet nach den Angaben des Herstellers) zur Entwicklung direkt auf die Membran aufgetragen, diese in Frischhaltefolie verpackt und für weni-

ge Minuten bzw. bis zu 2 h bei 37 °C inkubiert. Detektion der Chemilumineszenz und Bilddokumentation der markierten Proteinbanden erfolgten mit dem Gerät MicroChemi-Chemiluminescence (Biostep, Jahnsdorf) zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Substratzugabe.

15.4.4. Durchflusszytometrie

Nach der Präparation und Stimulation der primären Knochenmarkszellen, wie unter 10.2.2 beschrieben wurden die Zellen aus der Petrischale durch vorsichtiges Waschen mit PBS + 1% BSA abgelöst und zirka 1×10^6 Zellen pro Probe in eine 96 Lochplatte verteilt. Anschließend wurden die Platten bei 400xg zentrifugiert und die Zellen jeweils in 100µl FACS-Puffer resuspendiert. Nach einer dreißig minütigen Inkubation bei 0°C im Dunkeln erfolgte die Zugabe der mit den entsprechenden Farbstoffen gekoppelten Antikörper, die in Tabelle 7 aufgeführt sind, gefolgt von einer ein stündigen Inkubation auf Eis. Zum Ausschluss toter Zellen, die die Analyse beeinflussen könnten, wurden pro Probe 5 µg 7Aminoactinomycin D (7AAD) zugesetzt, die Proben erneut bei 400xg zentrifugiert, zweimal mit PBS +1% BSA gewaschen und im FACS-Puffer (20mM EDTA, 0,15g Natriumazetat, 2% v/v BSA) resuspendiert. Die Analyse erfolgte mit **BD FACS Cantoll** und die Analyse mit Hilfe der auf dieses Durchflusszytometer angepasste Software **FlowJo**.

IV. ERGEBNISSE

1. Konstruktion des mCherry-Expressionsvektor

1.1. Identifizierung der Insertionsstelle im ECTV-Genom

Zur Herstellung rekombinanter Ektromelieviren musste zunächst ein geeigneter Insertionsloкус für Fremdgene im Ektromelievirusgenom identifiziert werden und ein entsprechendes Expressionsplasmid konstruiert werden. Basierend auf einer Klonierungsstrategie, die sich für das Modifizierte Vacciniavirus Ankara bereits als effektiv erwiesen hatte, sollte die mCherry-Expressionskassette in einen Zwischengenbereich eingesetzt werden, der in der genomischen DNA des MVA zwischen den Genen G1L und I8R lokalisiert ist (Wyatt et al., 2009). Wie Abbildung 11 zeigt liegen beide Gene direkt nebeneinander im hoch konservierten Bereich des Vacciniavirus.

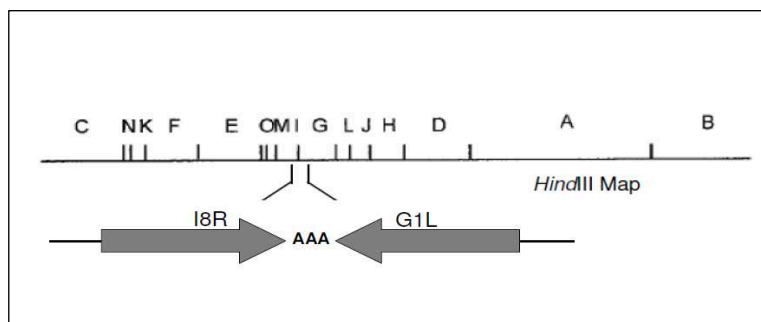


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Lokalisation der Gene G1L und I8R in der HindIII-Restriktionskarte des MVA-Genoms, die Pfeilrichtung zeigt die Orientierung der viralen Transkription, die im Zwischengenloкус vorhandene Sequenz ist durch Angabe der Basen schematisch dargestellt

Der Offene Leserahmen (ORF) G1L umfasst 1776 bp, die linksseitig abgelesen werden, der ORF I8R besteht aus 2031 bp, die nach rechts transkribiert werden. Dieser Zwischengenort erschien für den geplanten Einbau der mCherry-Expressionskassette in das Ektromeliegenom sehr geeignet, da so die Beeinflussung anderer funktioneller Sequenzen wie zum Beispiel der Promotoren ausgeschlossen wird. Die homologen Gene im Ektromelievirus Stamm Moskau (EVM) sind der ORF EVM063 für I8R, und dem Vacciniavirus G1L entspricht das Gen EVM064. Zur weiteren Überprüfung wurden die entsprechenden Gensequenzen des Ektromelievirus mit den Vacciniavirussequenzen, wie im Anhang dargestellt, verglichen.

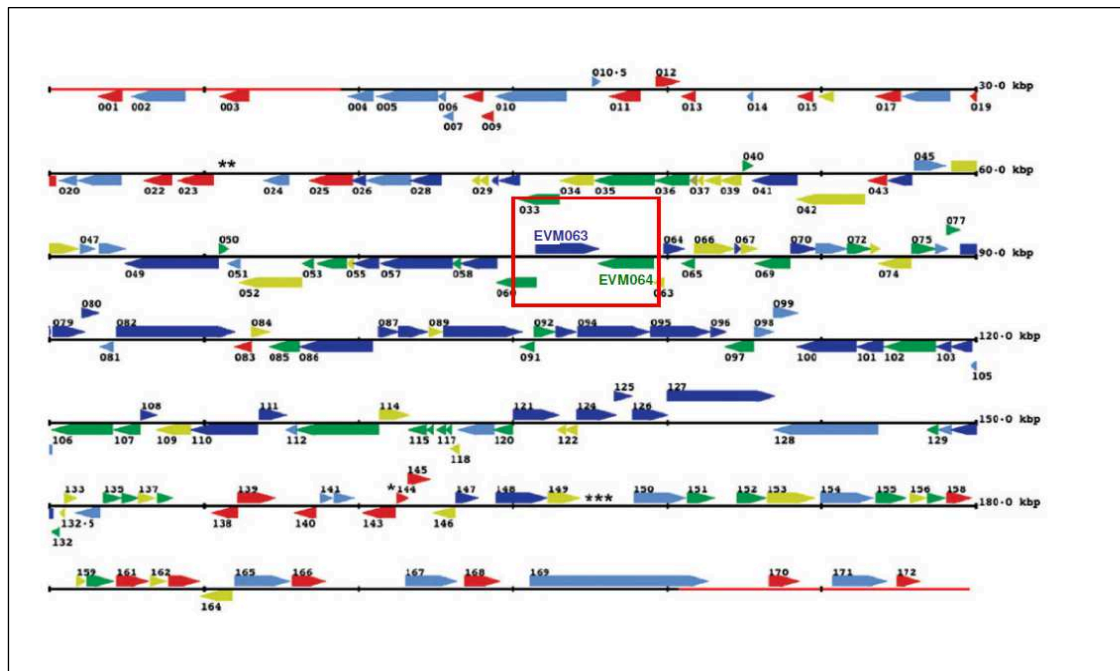
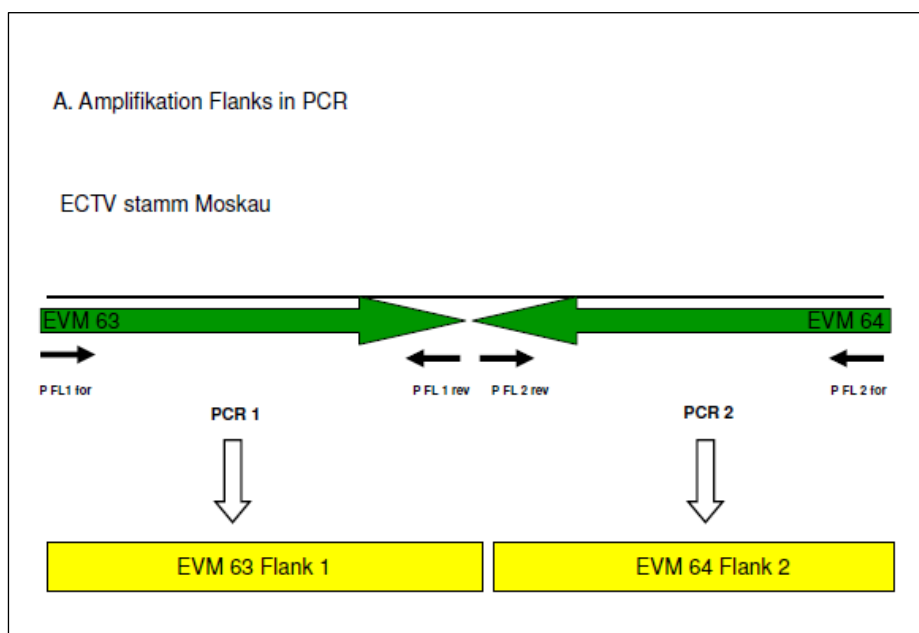


Abbildung 12: Schematische Genkarte von Ektromelievirus Stamm Moskau, modifiziert nach Buller, 2005, rot = Wirtsinteraktionsgene, grün = Strukturgene, dunkelblau = RNA und DNA Interaktionsgene, gelb = unbekannte Funktion, hellblau = schwach charakterisierte Genfunktionen, ITR-Regionen durch rot gekennzeichnet, 1 = Insertionslokus zwischen EVM063 und EVM064

Mit Hilfe der im Anhang dargestellten Sequenzanalyse konnte für die Leserahmen EVM063 bzw. EVM064 des Ektromelievirus eine hochgradige Übereinstimmung mit der Nukleinsäure des VACV MVA identifiziert werden (96 % EVM063 und I8R; 98 % EVM064 und G1L). Auf Aminosäureebene ergibt sich im direkten Vergleich der beiden Genprodukte eine noch höhere Konformität, die über 99 % für jedes Protein erreicht. Daher war anzunehmen, dass sich der Genbereich zwischen EVM063 und EVM064, in Analogie zum G1L-I8R Zwischengenlokus des MVA-Genoms, sich ebenfalls als neue Insertionsstelle im Ektromelievirusgenom eignet (siehe Abbildung12).

1.2. Klonierung von flankierenden ECTV-Gensequenzen und der mCherry-Expressionskassette

Zur Konstruktion des neuen Transferplasmids mussten zunächst die Elektromelievirus-Gensequenzen hergestellt werden, die den Einbau von heterologer DNA in den gewählten EVM063-EVM064-Zwischengenloкус dirigieren. Damit ein Fremdgen durch homologe Rekombination ins Genom eingebaut wird, müssen im Transfervektor die DNA-Sequenzen auf beiden Seiten der Expressionskassette identisch mit den den Insertionsloкус flankierenden DNA-Sequenzen im Virusgenom sein. Diese DNA-Fragmente werden vereinfacht als Flank1 und Flank2 bezeichnet. Für den Einbau in den Zwischengenbereich bestehen diese entsprechend der für das VACV MVA (Wyatt et al., 2009) etablierten Insertionsstrategie für EVM063 (=Flank1) aus den letzten 531 bp dieses Gens sowie den 702 bp, die das 3' Ende des ORF EVM064 (=Flank2) einschließen. Nach der PCR-Amplifikation wurden Flank1 (siehe Abbildung 15) und Flank2 (siehe Abbildung 16) über Elektrophorese im Agarosegel isoliert, aufgereinigt und nacheinander in die Multiple Klonierungsstelle des Plasmids pNEB193 (siehe Abbildung 14) inseriert. Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt.



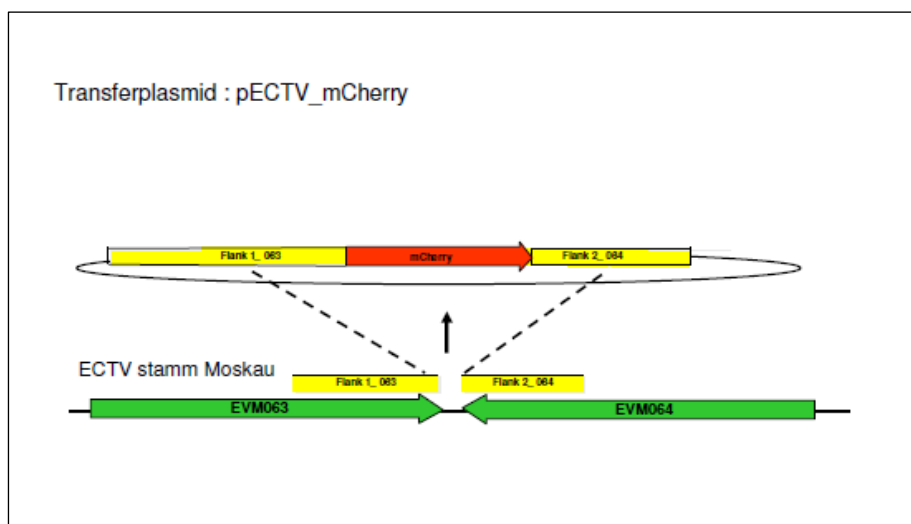
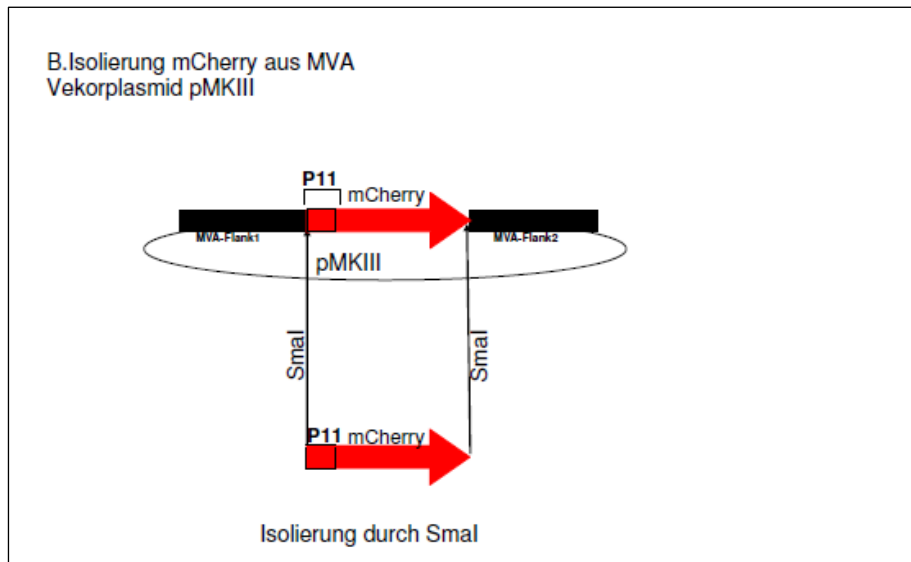


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung von pECTV_mCherry, A= PCR-Amplifikation von Flank1 und Flank2 aus ECTV-Genom mit Hilfe spezifischer Primer (=P Fl), B = Isolation des mCherry Gens aus pMKIII, C = Ligation in Ausgangsplasmid pNEB193

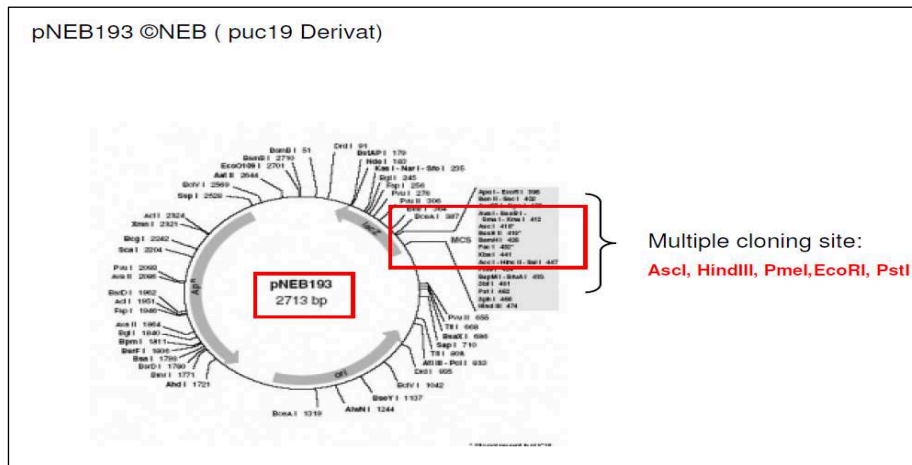


Abbildung 14: Schematische Darstellung des für die Klonierung verwendeten Ausgangsplasmids pNEB193, die Multiple Klonierungsstelle ist hervorgehoben und wichtige Restriktionsenzymschnittstellen sind angemerkt

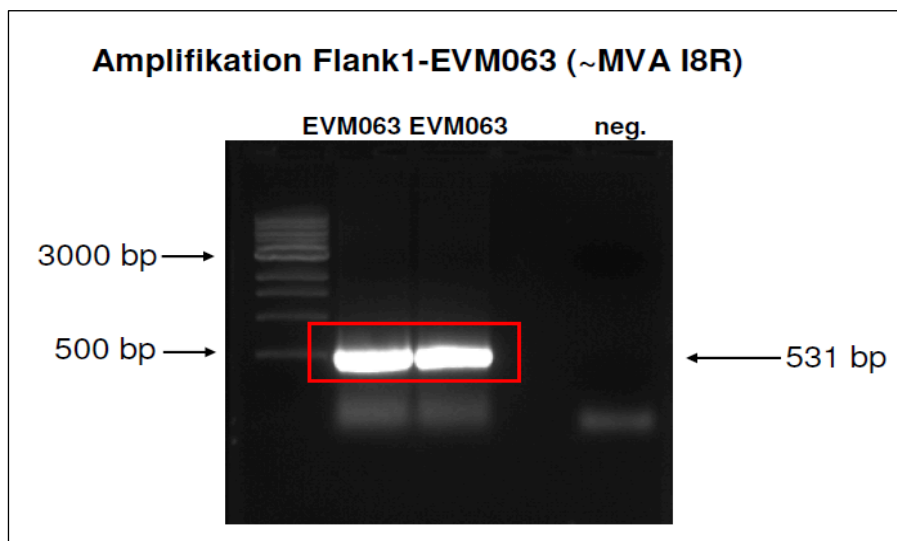


Abbildung 15: Flank 1 DNA nach PCR-Synthese und Auftrennung im Agarosegel

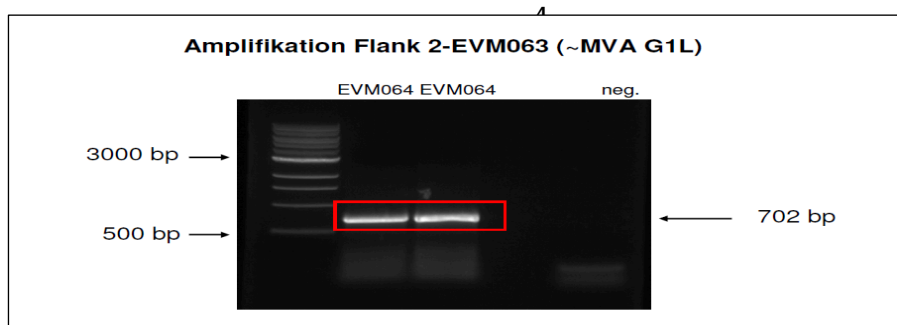


Abbildung 16: Flank 2 DNA nach PCR-Synthese und Auftrennung im Agarosegel

Die Expressionskassette enthält die Sequenz des mCherry-Gens, das unter der Transkriptionskontrolle des späten Vacciniavirus spezifischen Promotors P11 steht. Fremdgene, die durch den P11 Promotor kontrolliert werden, werden spät im Viruslebenszyklus abgelesen. Diese Expressionskassette wurde aus dem Plasmid pMKIII (siehe Abbildung 17) isoliert (Kremer, Volz, Kreijt, Lehmann, Sutter 2012 Easy and efficient protocols for working with recombinant vaccinia virus MVA; Meth Mol Biol in press).



Abbildung 17: Isolierung des 733 bp großen DNA-Fragments der mCherry-Expressionskassette aus dem MVA Vektorplasmid pMKIII. Das DNA-Fragment des Restplasmids ist 5400 bp groß

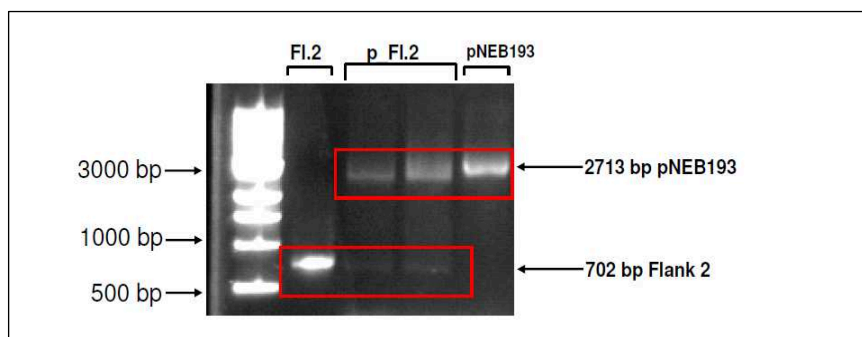


Abbildung 18: Durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen HindIII und PstI wurde der erfolgreiche Einbau des Flank 2 DNA Fragmentes in pNEB193 überprüft. Aus dem neuen Plasmid pNEB_Flank 2 ließen sich zwei DNA-Fragmente mit einem Molekulargewicht von 702 bzw. 2713 bp isolieren und im Agarosegel separieren

Zur Fertigstellung des neuen Plasmidvektors *pECTV_mCherry* wurde die Klonierungsabfolge aufgrund überlappender Restriktionszymsschnittstellen innerhalb der zu inserierenden Sequenzen wie folgt geplant:

1. Insertion von Flank 2 in die *Pst*I und *Hind*III-Schnittstelle des Ausgangsplasmids pNEB193 (siehe Abbildung 18)
2. Einbau der mCherry-Expressionskassette in die *Pme*I-Restriktionsstelle der Multiplen Klonierungsstelle (siehe Abbildung 19) von pNEB_Flank 2
3. Ligation von Flank 1 in die *Asc*I- und *Eco*RI-Schnittstellen des Plasmids pNEB_Flank 2_mCherry.

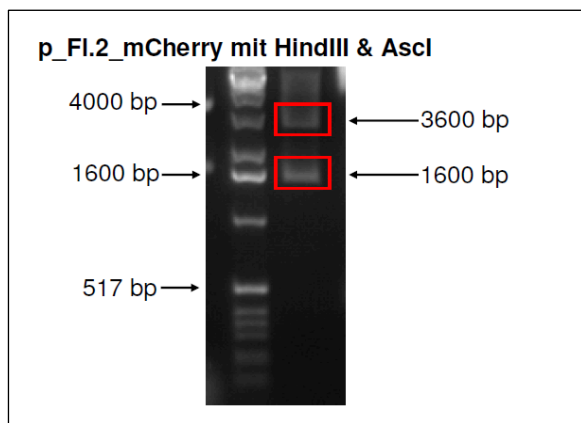


Abbildung 19: Das pNEB_Flank2_mCherry wurde durch Reaktion mit den Enzymen HindIII und AscI auf Vollständigkeit überprüft. Im Agarosegel konnten die erwarteten 3600 und 1600 bp großen DNA-Fragmente aufgetrennt werden

1.3. Charakterisierung des mCherry-Expressionsplasmids in Restriktionsanalyse und transienter Expression

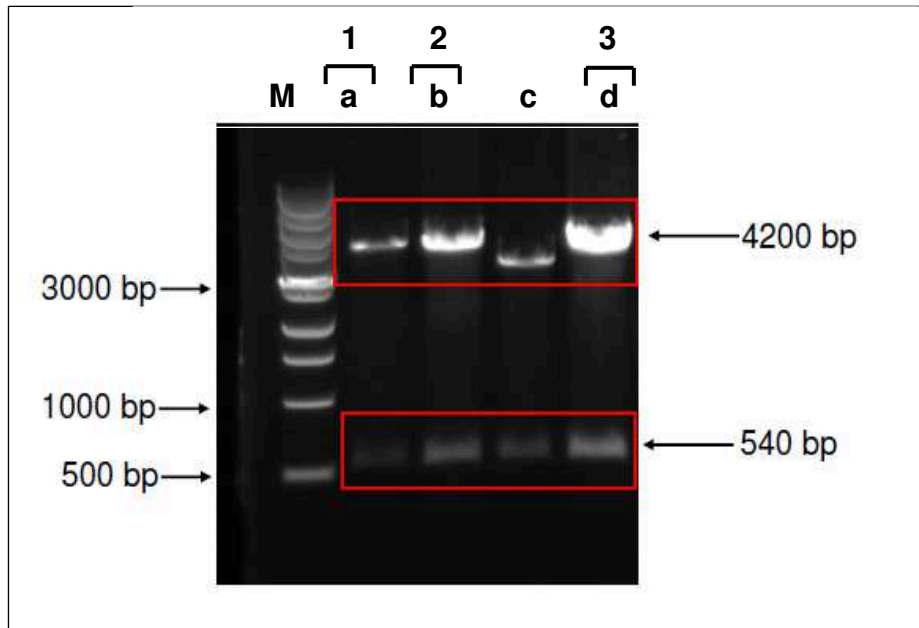


Abbildung 20: Behandlung mit Plasmidklone a,b,c,d Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* zur Kontrolle der korrekten Lage der Gene im *pECTV_mCherry*, nach Bestätigung über korrekten Einbau von Flank1, Flank2 und mCherry wurden a,b,d als Ausgangsplasmidklone 1,2,3 weiterverwendet

Nach der Herstellung des finalen Transferplasmides *pECTV_mCherry* wurde die genetische Integrität mehrerer Plasmidklone kontrolliert. Die Behandlung mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen erlaubt dabei die Prüfung der korrekten Lage der inserierten DNA-Sequenzen Flank 1, Flank 2 und der mCherry-Expressionskassette. Dazu wurden vier Isolate des Transferplasmids *pECTV_mCherry* mit den Enzymen *BamHI* und *EcoRI* geschnitten und die Bandengröße (erwartet waren 4200 bp und 540 bp) im Agarosegel überprüft (siehe Abbildung 20). In einer weiteren Analyse erfolgte eine Behandlung mit den Endonukleasen *EcoRI* und *PstI*, die bei richtigem Einbau der entsprechenden Gensequenzen im Agarosegel ein 3329 bp großes Fragment sowie ein 920 bp und 390 bp großes Fragment im Agarosegel auftrennen (siehe Abbildung 21).

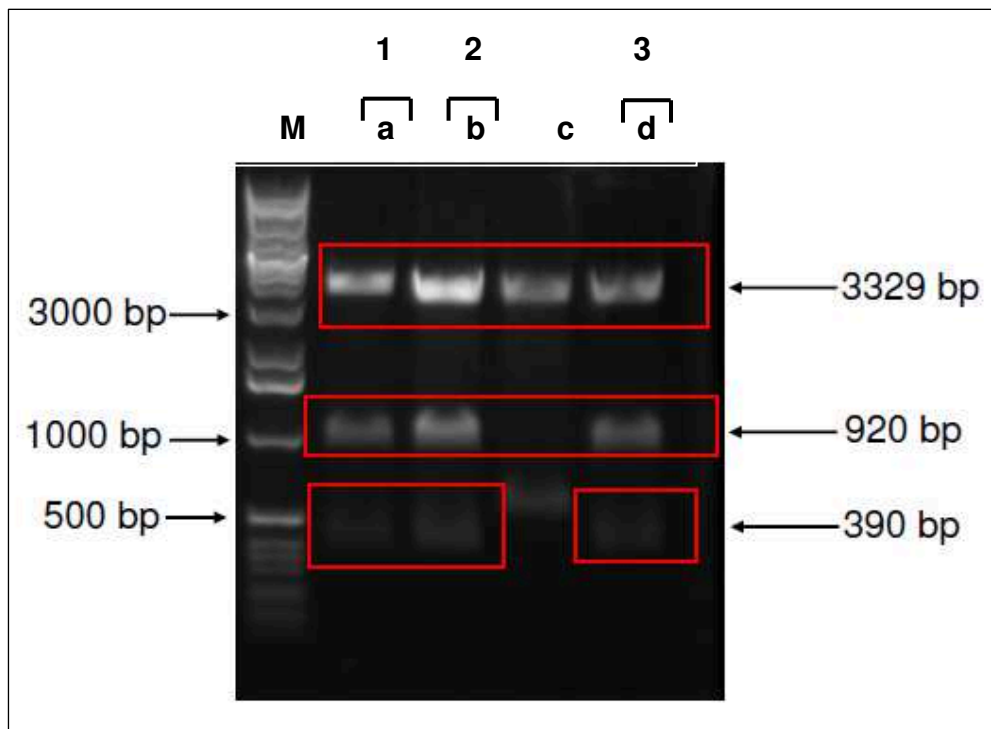


Abbildung 21: Behandlung mit Restriktionsenzymen EcoRI und PstI zur Kontrolle der korrekten Lage der Gene im pECTV_mCherry

Voraussetzung für einen funktionstüchtigen Einbau einer Expressionskassette mittels der homologen Rekombination war, dass die im Plasmid enthaltenen, flankierenden viralen Gensequenzen (Flank 1 und Flank 2) genau identisch mit der entsprechenden DNA-Sequenz an der Insertionsstelle im Genom sind. Zur Verifizierung wurde bei drei nach Restriktionsanalyse ausgewählten Plasmidklonen (*pECTV_mCherry1*, *pECTV_mCherry2*, *pECTV_mCherry3*) die Basenabfolge der flankierenden DNA durch Sequenzierung überprüft. Die Auswertung dieser Analyse bestätigte ein vollständig konserviertes Basenmuster der DNA-Sequenzen Flank 1 und Flank 2 in allen Transferplasmiden und somit deren Eignung zur Insertion in das ECTV-Genom.

In einem nächsten Schritt der Qualitätskontrolle des Transfervektors musste die Funktionsfähigkeit der mCherry-Expressionskassette getestet werden. Dies erfolgte in einem sogenannten „*transienten Expressionsversuch*“. Grundlage ist dabei die virusspezifische Ko-Expression des in der Plasmid-DNA eingebauten Fremdgens bei Einbringen des Plasmids in das Zytoplasma einer virusinfizierten Zelle. Hierzu wurden MA-104 Zellen mit

nicht-rekombinanten Ektromelievirus infiziert und mit je 2 µg der Plasmid-DNA von *pECTV_mCherry1*, *pECTV_mCherry2* und *pECTV_mCherry3* transfiziert. Die Infektion erfolgte hier im Gegensatz zu einer Transfektion-Infektion bei der Generierung rekombinanter Viren mit einer MOI von 5, also einer 100-fach höheren Dosis an Virus. Bereits 24 Stunden nach der Transfektion erlaubte die Sichtung unter UV-Licht am Fluoreszenzmikroskop den Nachweis einer Vielzahl rot leuchtender Zellen im Monolayer (siehe Abbildung 22).

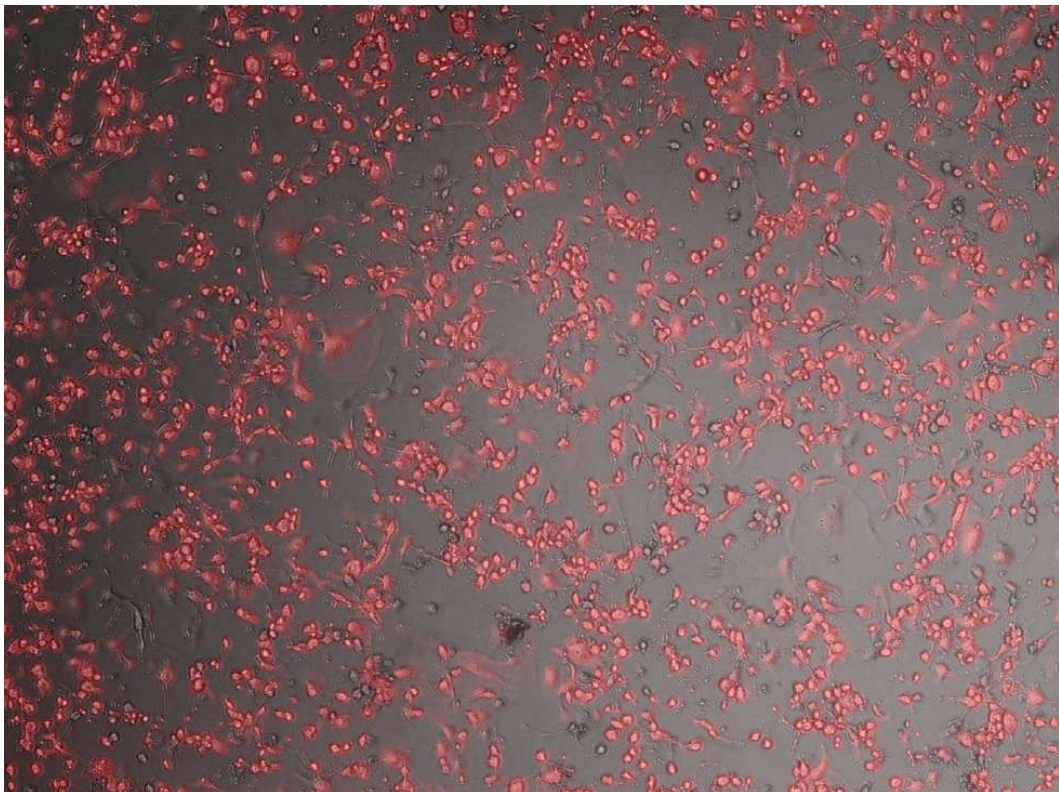


Abbildung 22: Detektion rot leuchtender, mCherry produzierender MA-104 Zellen bei UV-Licht im Fluoreszenzmikroskop 24 Stunden nach Transfektion von pECTV-mCherry und Infektion mit ECTV (MOI 5), Vergrößerung = 40x

Die rot fluoreszierenden Zellen zeigten dabei zum Teil bereits die typische Morphologie virusinfizierter Zellen mit Vergrößerung, schärferer Konturierung, Synzytienbildung und erster Abkuglung. Diese Beobachtung nach Plasmidtransfektion ließ bereits auf die Produktion des gewünschten mCherry-Proteins schließen. Zur weiteren Kontrolle wurden die mit pECTV_mCherry transfizierten und ECTV infizierten Zellen abgeerntet, Zelllysate hergestellt und diese im Western-Blot-Verfahren analysiert. Ein monoklonaler mCherry spezifischer Antikörper markierte auf dem Immu-

noblots eine deutliche Proteinbande von 26 Kilodalton(kDa), dem erwarteten Molekulargewicht von mCherry. Diese Ergebnisse bestätigten damit die Klonierung einer funktionstüchtigen mCherry-Expressionskassette im neu hergestellten Transfervektor (siehe Abbildung 23-24).

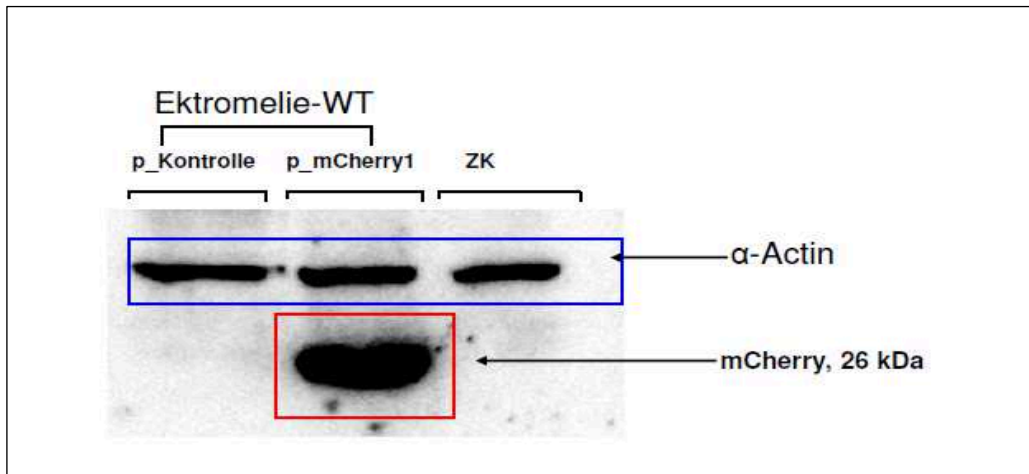


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten aus transientem Expressionsversuch, Ektromelie-Wildtyp infizierte Zellen mit Kontroll-Plasmid (=p_Kontrolle) und pECTV_mCherry1(p_mCherry1), ZK=MA-104

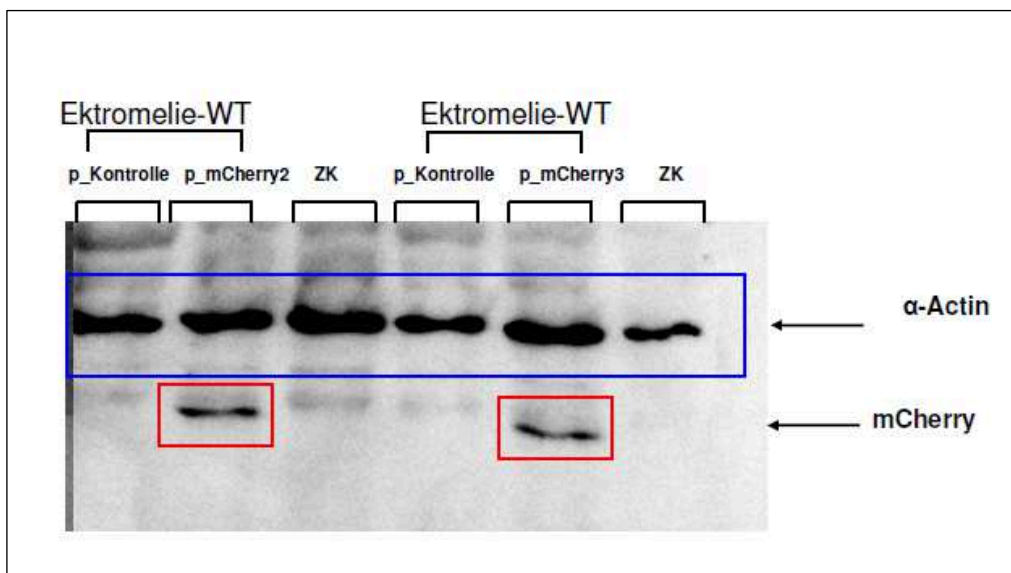


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von Proteinlysaten aus transientem Expressionsversuch, Ektromelie-Wildtyp infizierte Zellen mit Kontroll-Plasmid (=p_Kontroll) und pECTV_mCherry2 (p_Cherry2) und pECTV_mCherry3 (p_Cherry3), ZK=MA-104

2. Konstruktion rekombinanter ECTV zur Expression von mCherry

2.1. Generierung rekombinanter Viren nach DNA-Transfektion und ECTV-Infektion

Es ist charakteristisch für das Fluoreszenzprotein mCherry, nach Anregung mit UV-Licht rotes Licht zu emittieren. Somit bietet sich die Transfektion von mCherry in die Zellen zur Detektion verschiedenster biologischer Prozesse an. Somit erscheint mCherry auch geeignet als Markerprotein für das Ektromelievirus nach Einbau der kodierenden DNA in dessen Genom. Der Konstruktion eines solchen „*leuchtenden*“ Ektromelievirus dient der oben beschriebenen Rekombinationsvektor *pECTV_mCherry*. In diesem Plasmid steht das mCherry-Gen unter der Kontrolle des späten Vacciniavirus-Promotor P11.

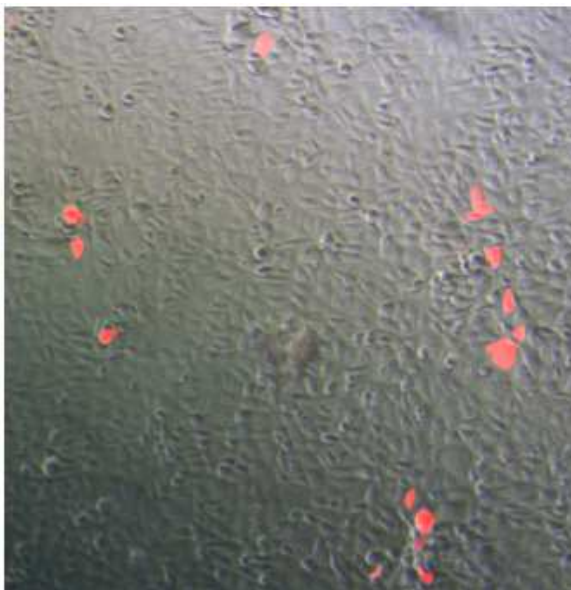


Abbildung 25: MA-104-Zellen, infiziert mit 0,05 MOI Ektromelievirus, 24 Stunden nach der Transfektion mit *pECTV_mCherry*, einzelne rot leuchtende Zellen sind erkennbar, Vergrößerung = 40x

Zur Generierung des neuen rekombinanten Ektromelie-mCherry-Virus wurde das Prinzip der homologen Rekombination genutzt. Zur Erhaltung einer günstigen genetischen Diversität der nachfolgend entstehenden rekombinanten Viren erfolgte die Transfektion–Infektion in drei getrennten Ansätzen jeweils mit einem der zuvor charakterisierten Plasmiden *pECTV_mCherry1*, *pECTV_mCherry2*, *pECTV_mCherry3*. Die neuen

rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren grenzten sich vom nicht rekombinanten Ektromelievirus durch die Synthese des rot fluoreszierenden mCherry ab, so dass eine Identifizierung rekombinanter Viren aufgrund der rot leuchtenden infizierten Zellen gut möglich war. Bereits 24 Stunden nach der Transfektion-Infektion waren einzelne leuchtende Zellen erkennbar (siehe Abbildung 25), diese „roten“ Zellen wurden dann für die weiteren Plauepassagen zur Aufreinigung des rekombinanten Ektromelie_mCherry-Virus selektiert und abgeerntet.

2.2. Isolierung klonaler ECTV-mCherry durch Plauepassagen

Die ersten Passagen nach der Transfektion-Infektion waren noch sehr geprägt durch eine große Anzahl Plaques von nicht rekombinanten Wildtyp-Viren. Mittels der Synthese des mCherry-Proteins konnte man rekombinante Ektromelie-mCherry-Viren gut im Fluoreszenzmikroskop identifizieren. Durch die fortlaufende Selektion der rot leuchtenden Virusplaques steigerte sich nach und nach der Anteil der ECTV-mCherry-Viren. Die Abbildungen 26 bis 28 verdeutlichen diese Entwicklung von anfangs höchstens 5 roten Zellen zu über 100 roten Virusplaques nach zirka 6 Passagen pro infizierte Vertiefung der Zellkulturplatte. Dagegen sank die Anzahl der nicht leuchtenden Wildtyp-Virusplaques. Diese Abbildungen dokumentieren außerdem die während der klonalen Aufreinigung des ECTV-mCherry beobachteten phänotypische Veränderung rekombinanter Virusplaques.

Der zytopathische Effekt durch das Ektromelia-Wildtypvirus war charakterisiert durch gleichmäßige Abkuglung infizierter Zellen mit nachfolgender Verschmelzung benachbarter Zellen zu granulierten, unregelmäßig geformten Zellhaufen (siehe Abbildung 29). Im weiteren Verlauf lösten sich die Zellen im Zentrum des Virusplaques und eine ausgeprägte Synzytienbildung war erkennbar. Zu Beginn der Plaueaufreinigungen war es noch sehr schwierig, Ektromelie-mCherry infizierte Zellen eindeutig anhand ihres zytopathischen Effektes zu identifizieren. Die so induzierten Veränderungen beschränkten sich auf ungleichmäßige Abkuglung der Zellen, Synzytienbildung, d.h. großflächige Zellverschmelzung, war noch nicht erkennbar und die Infektion rekombinanter Viren ließ sich nur durch die rote Fluoreszenz nachweisen (siehe Abbildung 26-28). In den nachfolgen-

den Passagen, mit fortlaufender Eliminierung des nicht rekombinanten Ektromelie-Wildtypvirus, zeigten auch die rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren immer deutlicher einen ausgeprägten zytopathischen Effekt mit Zellverschmelzung und lytischen Virusplaques. Hierbei war mit Hilfe der roten Fluoreszenz auch die Detektion sekundär virusinfizierter Zellen möglich, die noch keine sichtbaren Veränderungen aufwiesen. Der zytopathische Effekt der rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren unterschied sich nach 8. Passagen nicht mehr vom Wildtypvirus (siehe Abbildung 29-30).

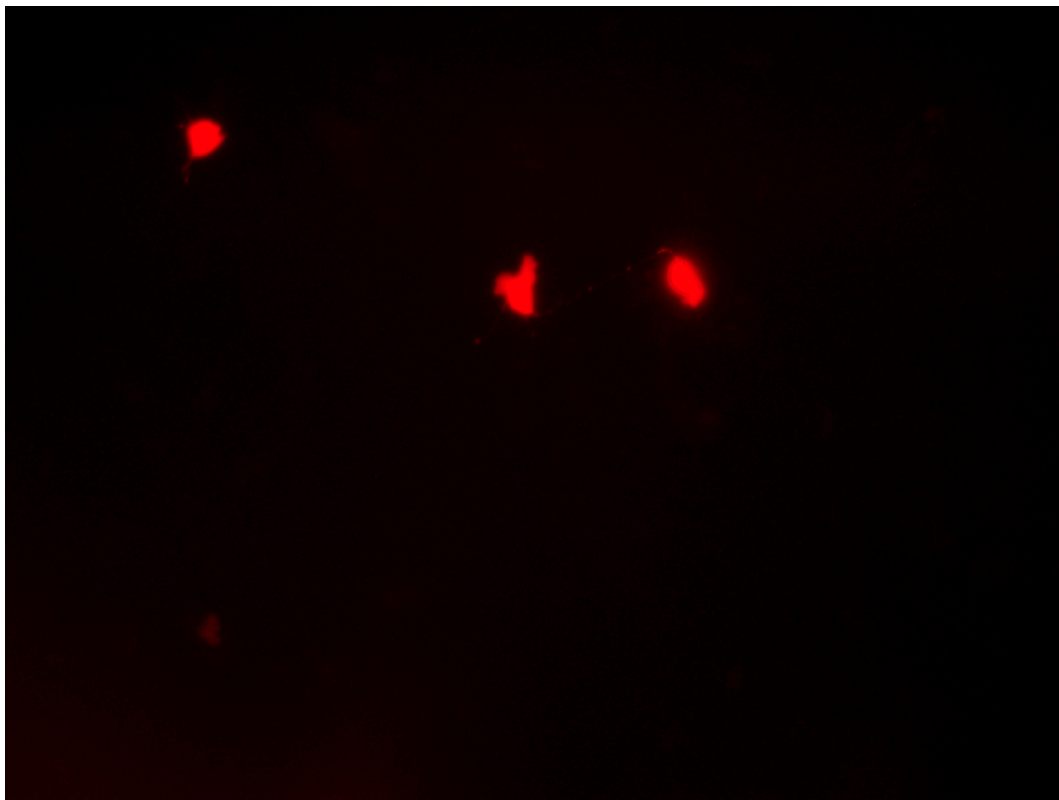


Abbildung 26: Ektromelie-mCherry infizierte Zellen, in der zweiten Plaquespassage nach Transfektionsinfektion, Vergrößerung = 40x

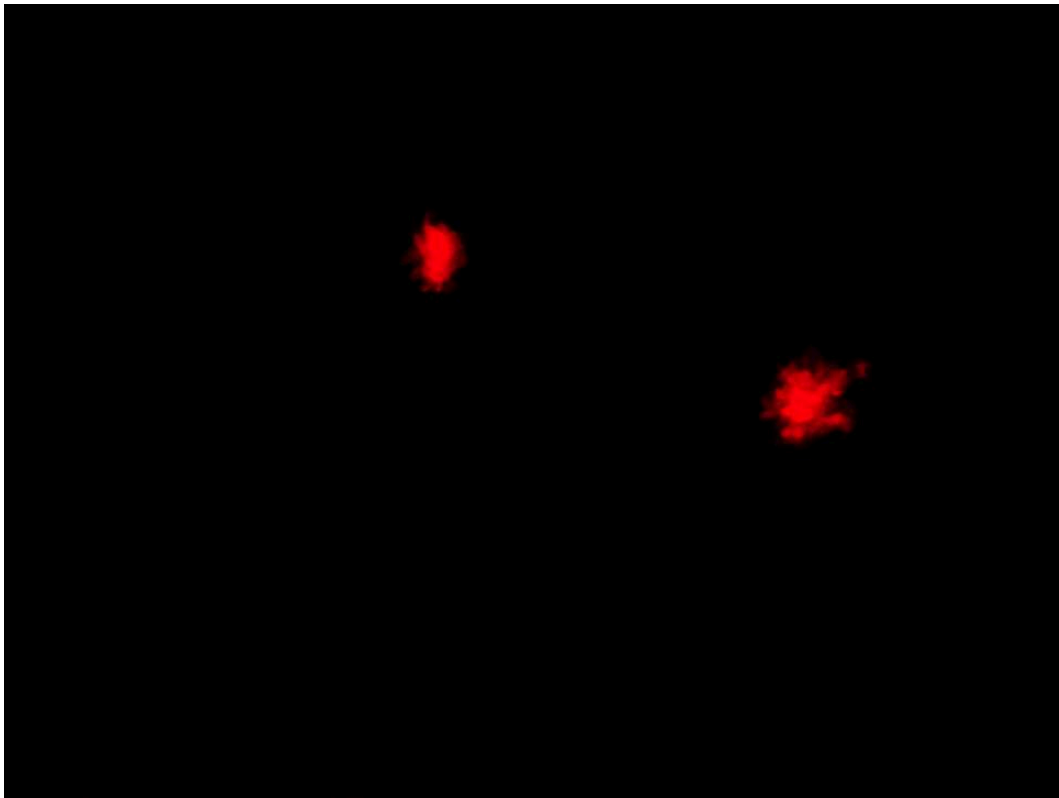


Abbildung 27: Ektromelie-mCherry infizierte Zellen, in der vierten Plaquespassage nach Transfektion-Infektion, Vergrößerung = 40x

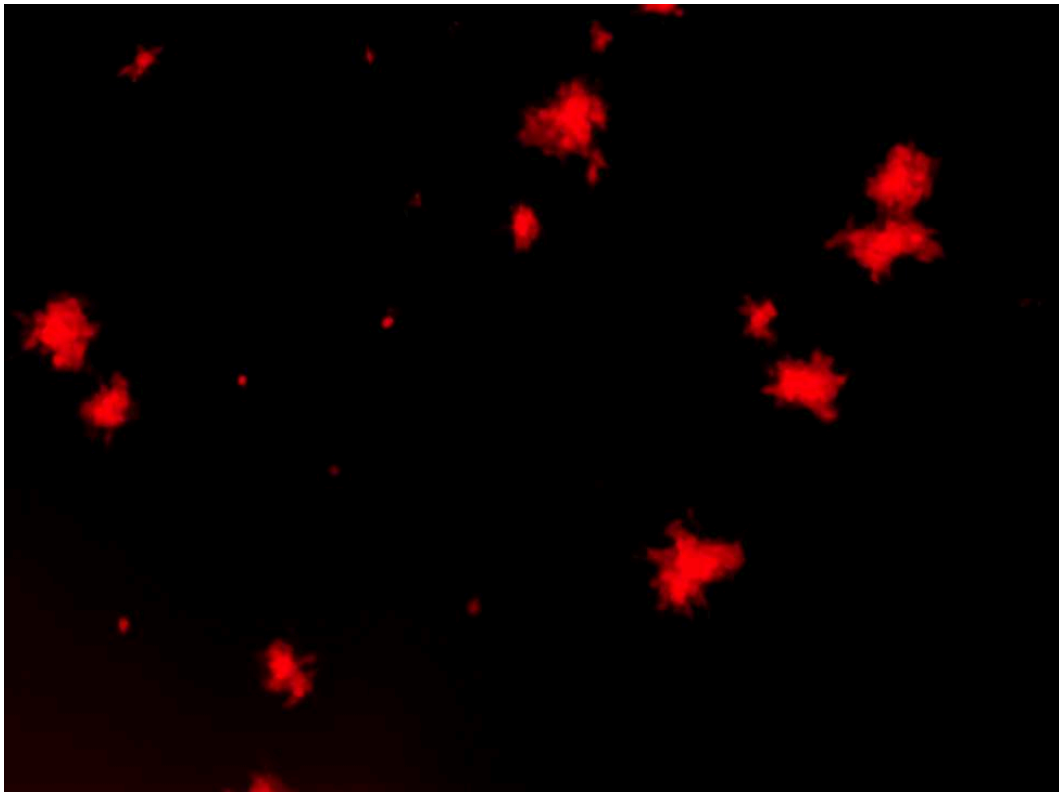


Abbildung 28: Ektromelie-mCherry infizierte Zellen, in der sechsten Plaquespassage nach Transfektion-Infektion, Vergrößerung = 40x

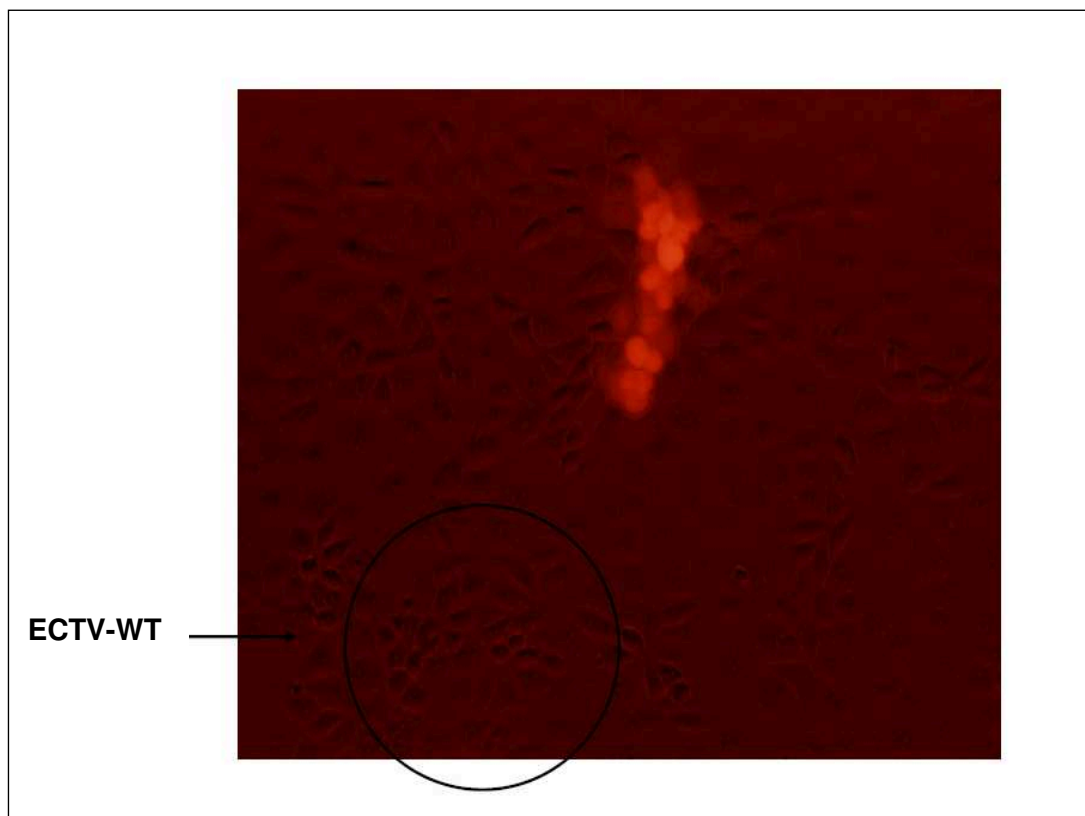


Abbildung 29: Ektromelie-mCherry Virus induzierter zytopathischer Effekt mit deutlicher Abkuglung der rot leuchtenden Zellen, daneben sind kleine nicht fluoreszierende Infektionsherde des Ektromelie-Wildtypvirus markiert, Vergrößerung = 100x

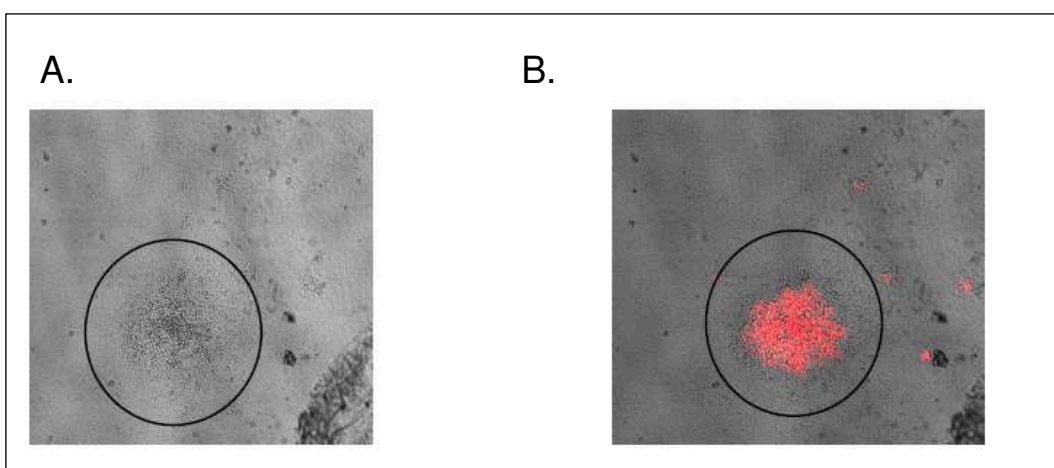


Abbildung 30: Mikroskopische Untersuchung der ECTV-mCherry Plaques: A= Einzelplaque in Phasenkontrastmikroskopie, B= Einzelplaque nach Überlagerung mit mCherry-Fluoreszenzmikroskopie. Die Fluoreszenz-Markierung erlaubt den Nachweis sekundärer Infektionsherde bei noch fehlender Ausbildung eines zytopathischen Effektes, Vergrößerung = 40x

Nach zehn aufeinanderfolgenden Plaquepassagen konnten optisch in der Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop keine nicht-leuchtenden Virusplaques mehr identifiziert werden. Zur genauen Charakterisierung dieser rekombinanten Viruskclone hinsichtlich ihres genetischen Reinheitsgrades diente die Analyse mit der PCR-Reaktion. Hierzu wurden spezifische PCR-Primer *ECTV-mCherry for* und *ECTV-mCherry rev* verwendet, die beim rekombinanten Ektromelievirus ein 1296 bp großes Fragment und beim Wildtyp-Virus ein 563 bp großes PCR-Produkt synthetisierten. Die Abbildung 31 zeigt, dass die sechs untersuchten Viruskclone ausschließlich das 1296 bp große Fragment aufwiesen. Im Gegensatz zu der als PCR-Kontrolle mitgeführten Ektromelie-Wildtyp-DNA, die eine 563 bp große Bande zeigte (siehe Abbildung 31). Das PCR-Ergebnis bestätigte die genetische Reinheit der charakterisierten Ektromelie-mCherry-Viruskclone, so dass von jedem der drei Ausgangsrekombinationsplasmide *pECTV-mCherry1*, *pECTV-mCherry2*, *pECTV-mCherry3* ein Virusklon vermehrt wurde.

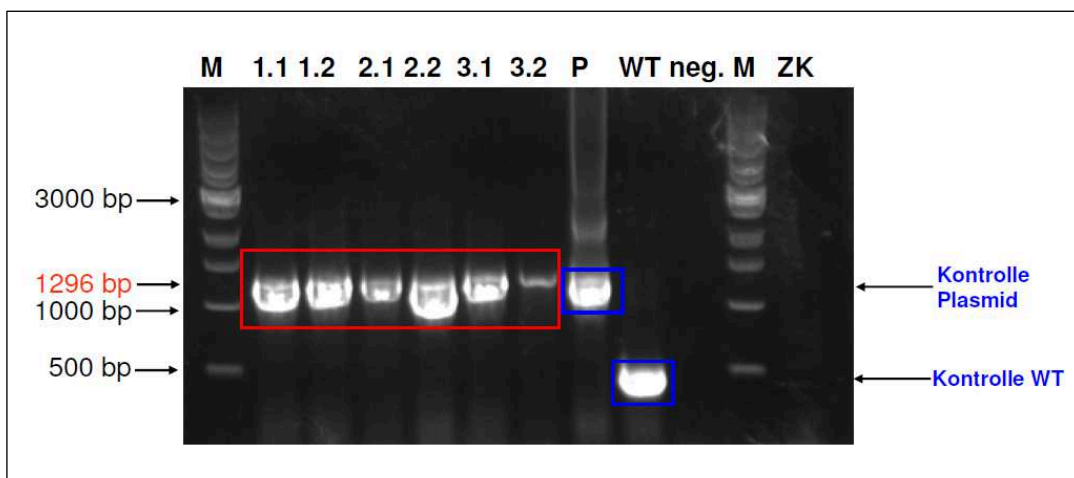


Abbildung 31: PCR-Analyse ausgewählter rekombinanter Viruskclone, zur Kontrolle dienen Plasmid-DNA von Ausgangsplasmid *pECTV-mCherry*=P, Ektromelie-Wildtyp-DNA=WT, Wasserkontrolle=neg. und Zellkontrolle=ZK, der Größenbestimmung dient 1-kb DNA Ladder der Firma NEB= M

2.3. Molekulare Charakterisierung der finalen ECTV-mCherry

Isolate

Nach der Amplifikation wurde die Virus-DNA der finalen *Ektromelie-mCherry1*, *Ektromelie-mCherry2* und *Ektromelie-mCherry3* mittels PCR-Analyse auf genetische Stabilität untersucht (siehe Abbildung 32). Hierbei konnte bei den rekombinanten Ektromelieviren nur die 1296 bp große Bande detektiert werden, die spezifisch für homozygote rekombinante Genexpression war.

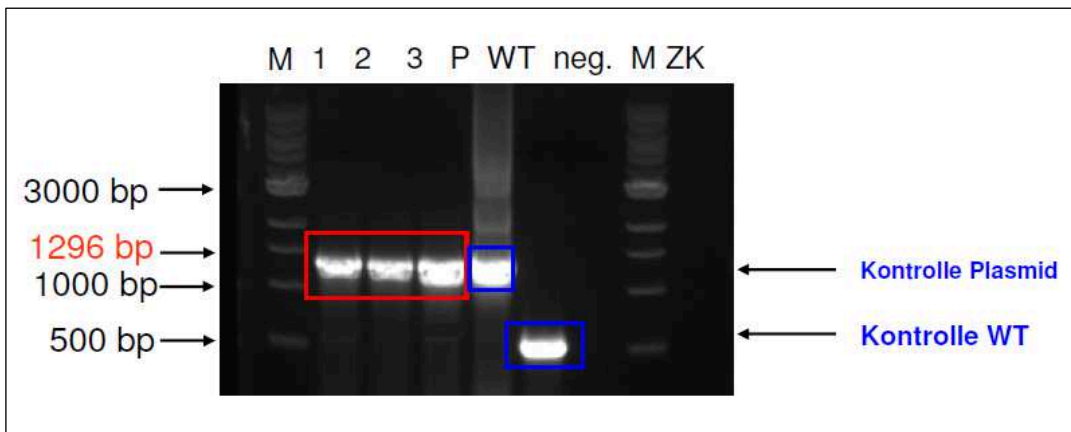


Abbildung 32: PCR-Analyse der finalen rekombinanten Ektromelie-mCherryviren_1, 2,3, zur Kontrolle dienen Plasmid-DNA von Ausgangsplasmid pECTV-mCherry=P, Ektromelie-Wildtyp-DNA=WT, Wasserkontrolle=neg. und Zellkontrolle=ZK, der Größenbestimmung dient 1-kb DNA Ladder der Firma NEB= M

3. Charakterisierung der ECTV-mCherry im Infektions-Experiment in Zellkultur

3.1. Rekombinante Genexpression in MA-104-Zellen

Zur detaillierteren Analyse des während des viralen Lebenszyklus produzierten rekombinanten Proteins wurden verschiedene Zeitpunkte der Infektion unter besonderer Beachtung der mCherry-Qualität und -Quantität untersucht. Hierzu wurden aus mit *Ektromelie-mCherry-Virus 1*, *Ektromelie-mCherry-Virus 2*, *Ektromelie-mCherry-Virus 3* und dem *Ektromelie-Wildtypvirus* infizierten MA-104-Zellen Proteinlysate hergestellt und im Western-Blot mit Hilfe mCherry-spezifischer, monoklonaler Antikörper analysiert. Wie erwartet konnte beim wildtypischen Ektromelievirus zu keinem Zeitpunkt der Infektion die 26 k. Da große Proteinbande detektiert werden

(siehe Abbildung 33). Dagegen zeigten alle rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren beginnend vier Stunden nach der Infektion die stabile Synthese des mCherry- Proteins. Unterschiede zwischen den drei rekombinanten Viren ließen sich wie folgt erkennen: *Ektromelie-mCherry-Virus 1* exprimierte das Protein konstant über den gesamten Zeitraum der Untersuchung, lediglich nach 72 Stunden konnte eine man geringe Reduktion der Bandenstärke erkennen, gleichzeitig ließ sich aber auch bei der als Kontrolle für die Zellmenge nachgewiesenen α -Actin-Bande eine Abschwächung feststellen (siehe Abbildung 34). Die Untersuchung der Infektion mit Ektromelie-mCherry-Virus 2 resultierte in der Darstellung einer schwächeren mCherry-Bande, wobei aber auch innerhalb dieser Infektionskinetik eine deutliche Steigerung der mCherry-Produktion erkennbar war. Ungewöhnlich erschien hier, dass 48 Stunden nach Beginn der Infektion weder bei der α -Actin- Kontrolle noch beim mCherry eine Bande zu detektieren war, nach 72 Stunden aber beide Proteine wieder in guter Intensität nachweisbar waren. Dieses Ergebnis war aber vermutlich auf ein lokalisiertes Artefakt bei der technischen Durchführung des Blotvorgangs zurückzuführen, wie zum Beispiel dem Auftreten von Luftblasen zwischen der Nitrozellulosemembran und dem SDS-Gel (siehe Abbildung 35). *Ektromelie-mCherry-Virus 3* zeigte eine über den gesamten Verlauf der Infektion zunehmende Produktion des 26 kDa großen Proteins in guter Übereinstimmung mit der mittels α -Actin detektierten gesamten Proteinmenge (siehe Abbildung 36).

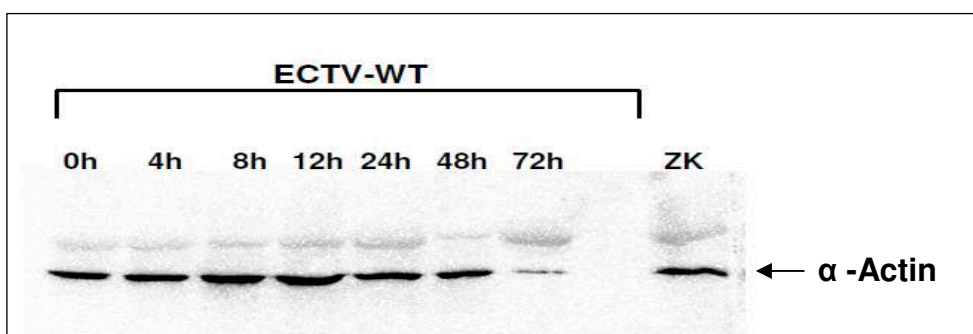


Abbildung 33: Western-Blot-Untersuchung von Proteinlysaten 0,4,8,12,24,48,72 Stunden nach der Infektion mit Ektromelie-Wildtypinfektion mittels monoklonaler mCherry-Antikörper. Der Nachweis von α -Actin dient dabei als Ladekontrolle für die insgesamt eingesetzte Proteinmenge

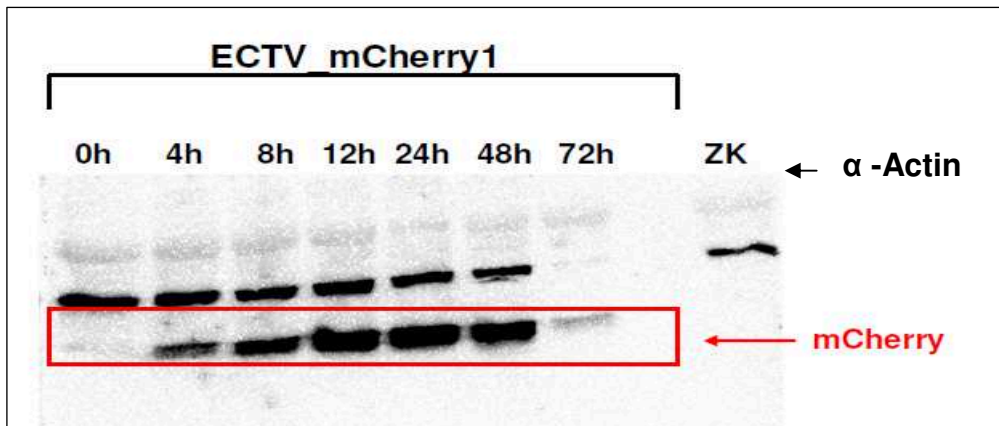


Abbildung 34: Western-Blot-Untersuchung von Proteinlysaten 0,4,8,12,24,48,72 Stunden nach der Infektion mit Ektromelie-mCherry-Virus 1 mittels monoklonaler mCherry-Antikörper, α -Actin dient dabei als Ladekontrolle

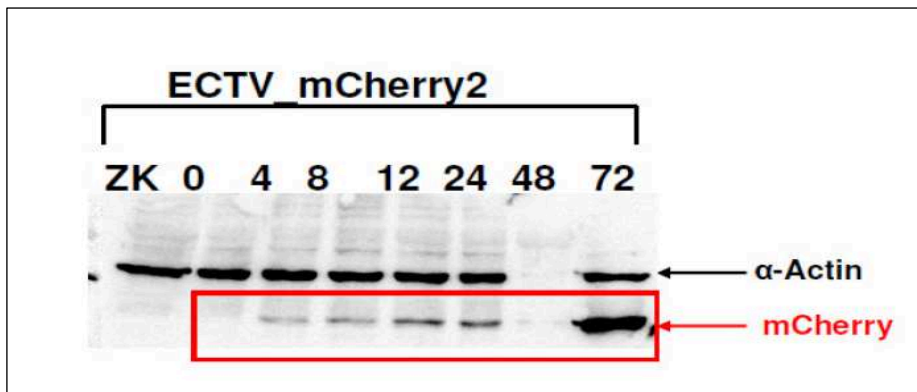


Abbildung 35: Western-Blot-untersuchung von Proteinlysaten 0,4,8,12,24,48,72 Stunden nach der Infektion mit Ektromelie-mCherry-Virus 2 mittels monoklonaler mCherry-Antikörper, α -Actin dient dabei als Ladekontrolle

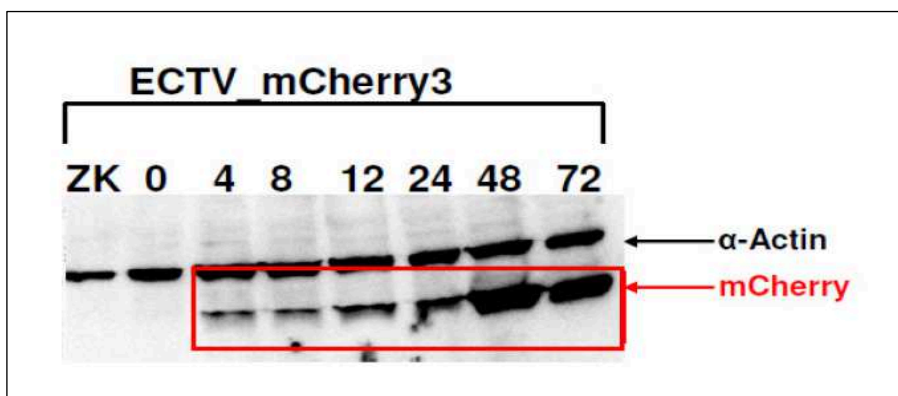


Abbildung 36: Western-Blot-Untersuchung von Proteinlysaten 0,4,8,12,24,48,72 Stunden nach der Infektion mit Ektromelie-mCherry-Virus 3 mittels monoklonaler mCherry-Antikörper, α -Actin dient dabei als Ladekontrolle

Die Fähigkeit eines Virus sich ausgehend von einzelnen infizierten Zellen über den gesamten Zellmonolayer auszubreiten ist sehr wichtig für seine Infektiösität und Virulenz. Bei den Orthopockenviren wurde diese Eigenschaft ausführlich für das Vacciniavirus charakterisiert. Eine Schlüsselrolle kommt hier den Extrazellulären Virionen (EV) zu, die im Gegensatz zu den Intrazellulären Virionen (IV) kontinuierlich während der viralen Replikation aus der infizierten Zelle ausgeschleust werden und die vorwiegend der Neuinfektion benachbarter Zellen dienen. Erkennbar wird dies durch die sogenannte „Satellitenbildung“, hierbei ist zentral ein primärer Infektionsherd sichtbar und um diesen herum verteilen sich viele kleinere Virusplaques, die Satelliten. Um sicherzustellen, dass diese für die Virusbiologie bedeutende Fähigkeit bei den rekombinanten Ektromelieviren erhalten war, wurden einzelne Virusplaques der *Ektromelie-mCherry-Viren* bezüglich ihrer Ausbreitungskompetenz über einen MA-104-Zellmonolayer untersucht. Dies erfolgte nach Infektion von MA-104 Zellen mit einer MOI von 100 Viruspartikeln pro Zellplattenvertiefung.

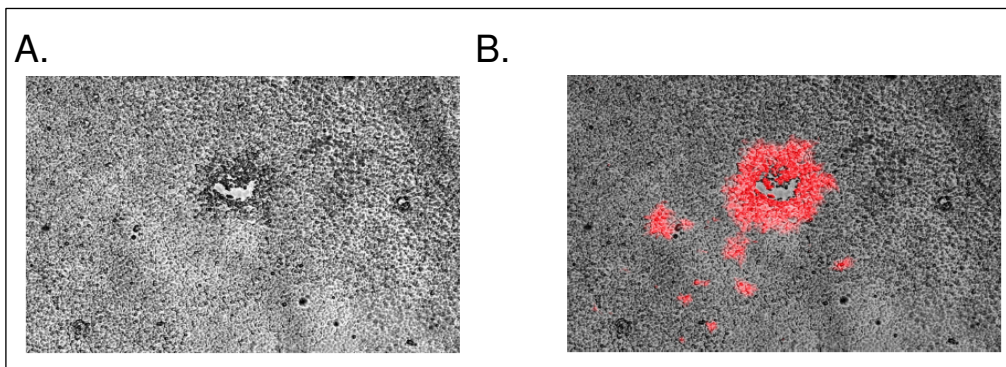


Abbildung 37: Ektromelie-mCherry Virusplaques mit beginnender Satellitenbildung 48 Stunden nach der Infektion, A= Phasenkontrastmikroskopie. B= Phasenkontrastmikroskopie mit Überlagerung mCherry-Fluoreszenzkanal, Vergrößerung = 40x

Die Abbildungen 37 bis 39 zeigen wie sich ausgehend von einem zentralen Fokus die Viren von Zelle zu Zelle und z.T. über nicht-infizierte Nachbarzellen hinweg ausbreiteten bis sich um die großen Primärplaques ein Gürtel aus kleineren Satellitenplaques gebildet hatte. Diese sekundären Virusplaques produzierten erneut infektiöse Virionen und initiierten eine neue Serie von Infektionsereignissen, so dass letztlich jede Zelle virusinfiziert ist. Bemerkenswert ist, dass durch die mCherry-Fluoreszenz die Satellitenherde schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt detektiert werden

konnten, ohne dass mittels Phasenkontrastmikroskopie sekundäre Infektionsherde sichtbar waren (siehe Abbildung 37).

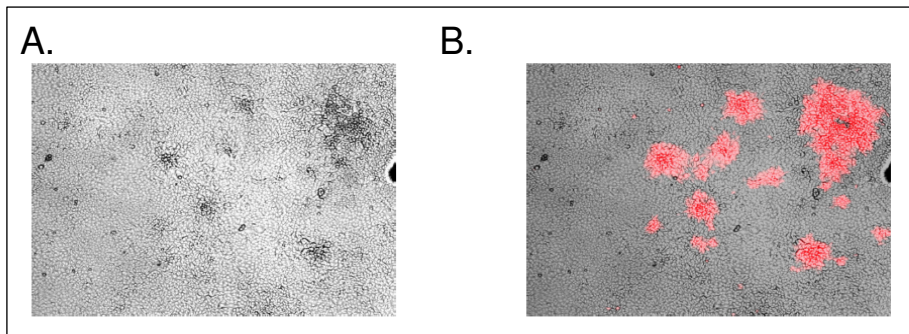


Abbildung 38: Ektromelie-mCherry Virusplaques mit beginnender Satellitenbildung 72 Stunden nach der Infektion, A= Phasenkontrastmikroskopie. B= Phasenkontrastmikroskopie mit Überlagerung mCherry-Fluoreszenzkanal, Vergrößerung = 40x

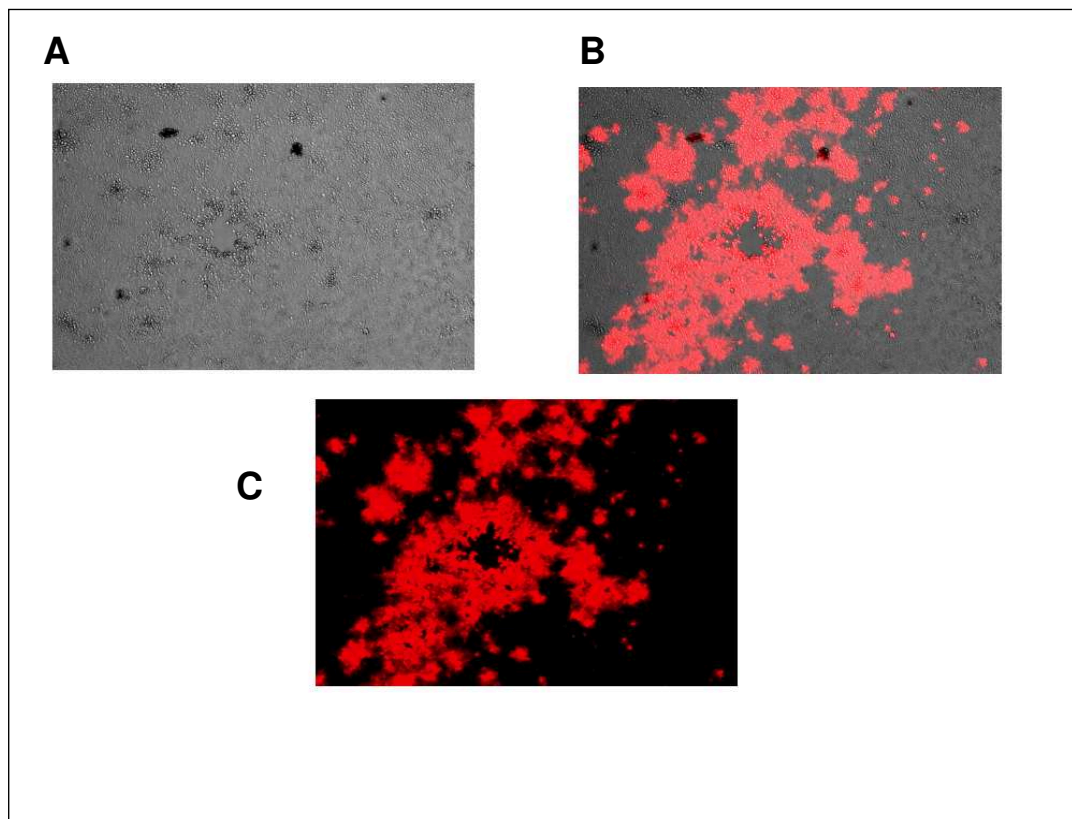


Abbildung 39: Ektromelie-mCherry-Virusplaques mit beginnender Satellitenbildung 96 Stunden nach der Infektion, A= Phasenkontrastmikroskopie. B= Phasenkontrastmikroskopie mit Überlagerung mCherry-Fluoreszenzkanal C= Fluoreszenzmikroskopie mit mCherry-Filter, Vergrößerung = 40x

3.2. Wachstumsanalyse in MA-104-Zellen

Wachstumsanalysen ermöglichen die direkte arithmetische Bewertung der Effizienz eines Virus, sich produktiv in bestimmten Zellen zu vermehren. Dies ist von besonderer Bedeutung bei der Charakterisierung rekombinanter Viren, da im direkten Vergleich mit dem nicht rekombinanten Virus Abweichungen erkennbar sind, die auf Beeinflussungen des Lebenszyklus durch die Fremdgeninsertion beruhen können. Die Mehrschritt Wachstumsanalyse untersucht die Fähigkeit eines Virus sich von Zellen zu Zelle über den gesamten Monolayer auszubreiten. Dafür infiziert man Zielzellen mit einer niedrigen MOI (0,05 PFU pro Zelle), erntet diese infizierten Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten und bestimmt die Viruslast der erhaltenen Suspensionen durch Rücktitration der Infektösität auf Plaquebildende Einheiten in einer permissiven Zellkultur. Mittels Immunfärbung können die Virusplaques hierbei direkt angefärbt und ausgezählt werden. Die Ergebnisse der verschiedenen Zeitpunkte können in direkter Relation zueinander bewertet werden und erlauben so eine Aussage über die Produktivität der Virusvermehrung in bestimmten Zelllinien. MA-104-Zellen sind als Zelllinie zur Amplifikation von Ektromelieviren etabliert. Eine erste, in diesen Zellen durchgeführte Mehrschritt Wachstumsanalyse zeigte, für die Viren Ektromelie-mCherry-Virus 2, Ektromelie-mCherry-Virus 3 und das Ektromelie-Wildtypvirus ein sehr ähnliches Replikationsverhalten auf MA-104. Dagegen hob sich das Ektromelie-mCherry1 Virus durch eine bessere Vermehrungseffizienz hervor. Beginnend mit einem Titer von 1×10^4 PFU/ml erhöhte sich die Virusmenge innerhalb der folgenden 12 Stunden auf zirka 1×10^5 PFU/ml. Bereits nach 24 Stunden überragte das Ektromelie-mCherry-Virus 1 mit einem um eine log₁₀-Stufe höheren Virustiter von 1×10^7 PFU/ml (siehe Abbildung 40) die zwei anderen rekombinanten Viren und das Wildtyp-Virus, welche im Durchschnitt einen Titer von 1×10^6 PFU/ml aufwiesen (siehe Abbildung 41-42). Diese hohen Titer an infektiösem Virus waren bis zum Ende des Experimentes nach 72 Stunden stabil nachweisbar, steigerten sich aber nicht oder lediglich geringfügig.

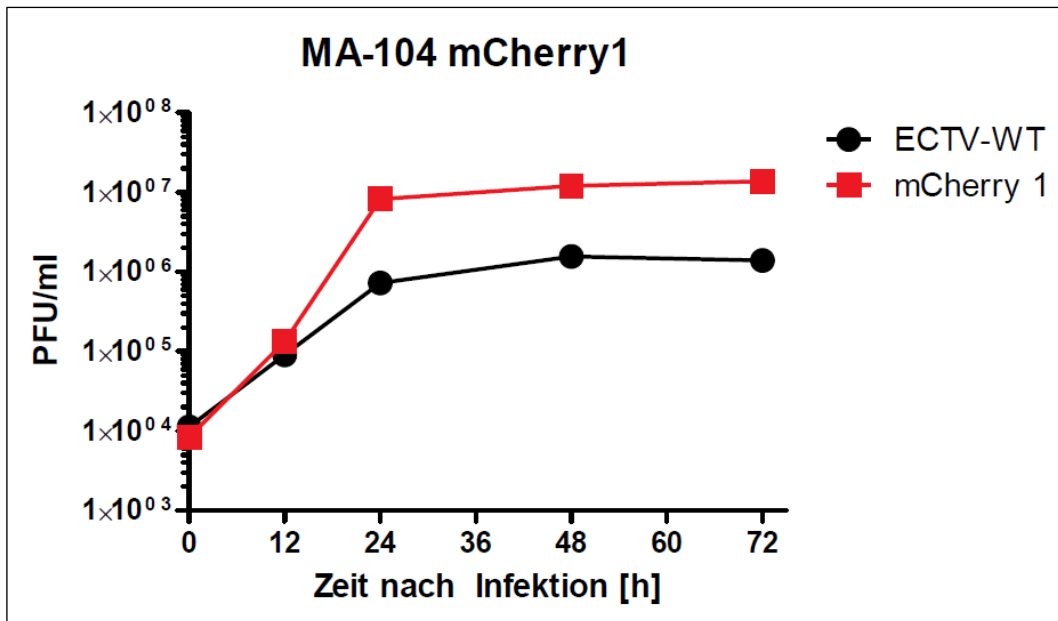


Abbildung 40: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 1 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MA-104, Infektion mit 0,05 PFU

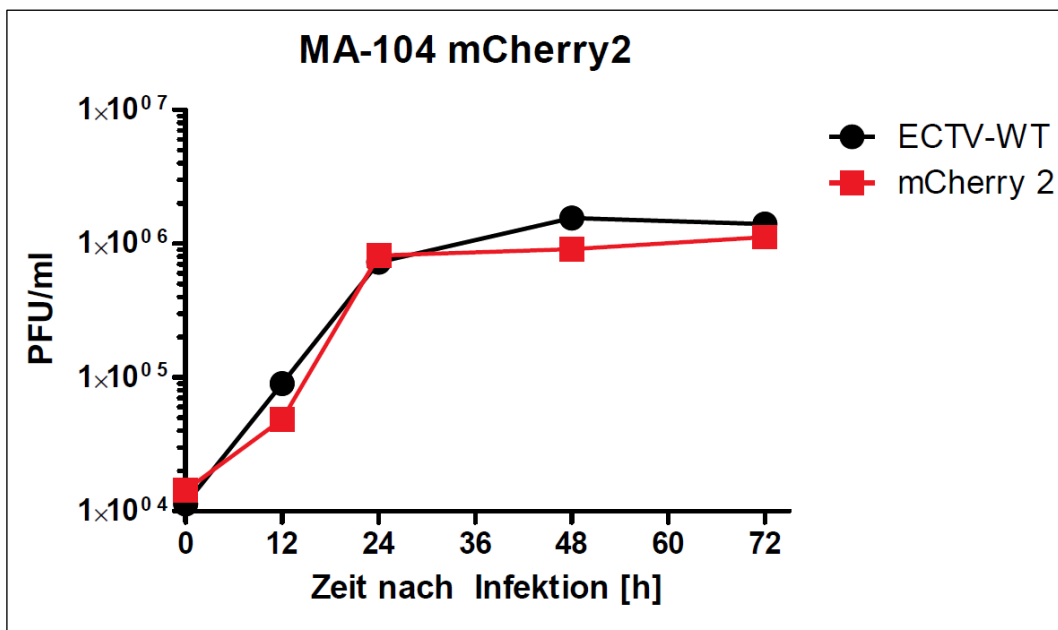


Abbildung 41: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MA-104, Infektion mit 0,05 PFU

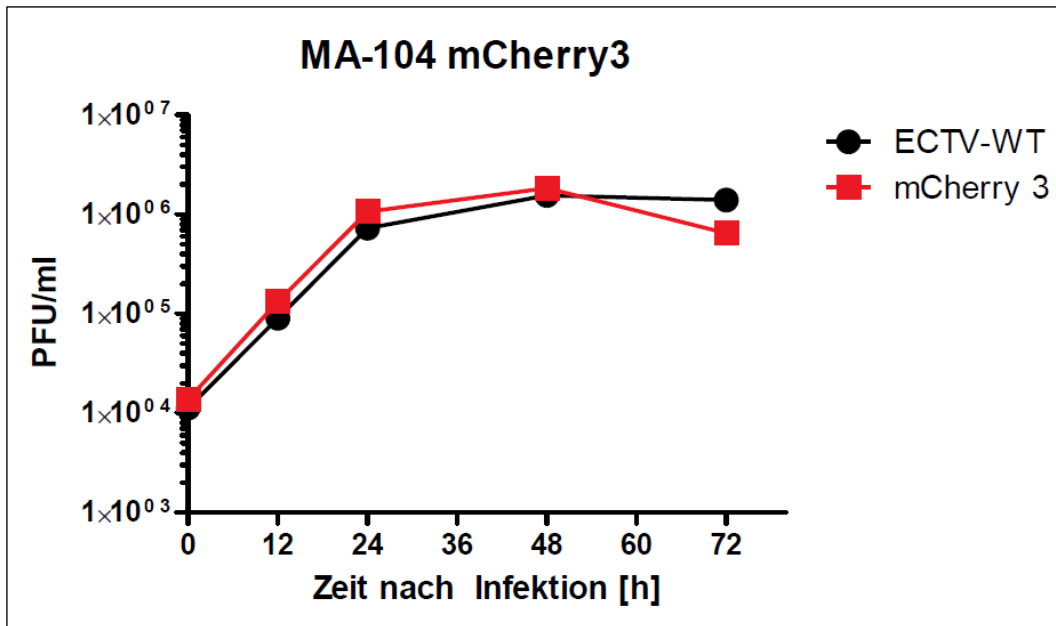


Abbildung 42: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 3 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MA-104, Infektion mit 0,05 PFU

3.3. Wachstumsanalyse und rekombinante Genexpression in etablierten Zelllinien der Maus

Zur biologischen Charakterisierung sollte das Wachstumsverhalten der rekombinanten Ektromelieviren auf verschiedenen weiteren Zelllinien analysiert werden. Der natürliche Wirt des Ektromelievirus ist die Maus. Daher ist anzunehmen, dass alle an der viralen Modulation des Wirtsmetabolismus beteiligten Faktoren und Mechanismen spezifisch an die Maus adaptiert sind. Im Hinblick auf eine zukünftige Verwendung des Ektromelie-mCherry-Virus für *in vivo* Experimente in der Maus, erschien es von außerordentlicher Wichtigkeit, die Wachstumskompetenz der rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren in Zellen murinen Ursprungs zu untersuchen. Auf diese Weise sollte evaluiert werden, dass die natürliche Wachstumskompetenz auf Maus-spezifischen Zellen erhalten geblieben war. In einem ersten Experiment wurden Untersuchungen zum Mehrschrittwachstum von Ektromelie-mCherry-Virus 1, Ektromelie-mCherry-Virus 2, Ektromelie-mCherry-Virus 3 und Ektromelie-Wildtyp in Mausembryofibroblasten (MEF) durchgeführt. MEF sind von embryonalem Bindegewebe abstammende Zelllinien, die ein häufig genutztes, adäquates System zur Evaluie-

rung von Virusinfektionen in Zellen natürlichen murinen Ursprungs repräsentieren. Auch in diesen Zellen war im Vergleich zu den anderen Viren eine überdurchschnittlich gute Vermehrungsfähigkeit des Ektromelie-mCherry-Virus 1 zu erkennen. Dagegen zeigten Ektromelie-mCherry-Virus 2, Ektromelie-mCherry-Virus 3 und das nicht rekombinante Wildtyp-Virus ein ähnliches Wachstumsverhalten. 12 Stunden nach Beginn der Infektion steigerte sich bei allen vier Viren die Virusinfektiösität um eine Log10-Stufe auf 1×10^5 PFU/ml. Ektromelie-mCherry-Virus 2, Ektromelie-mCherry-Virus 3 und nicht rekombinantes Virus behielten diese Virustiter bis zum Ende des Experimentes bei (siehe Abbildung 44-45), wohingegen Ektromelie-mCherry-Virus 1 nach weiteren 12 Stunden eine erneute Erhöhung des Titters um eine Log10-Stufe auf mehr als 1×10^6 PFU/ml erreichte (siehe Abbildung 43).

Das Ergebnis der Mehrschrittwachstumsanalyse lässt auf eine produktive Ektromelievirusvermehrung in MEF schließen. Der weiteren Charakterisierung der Ektromelie-mCherry-Viren diente die Untersuchung mit Hilfe des Lichtmikroskops.

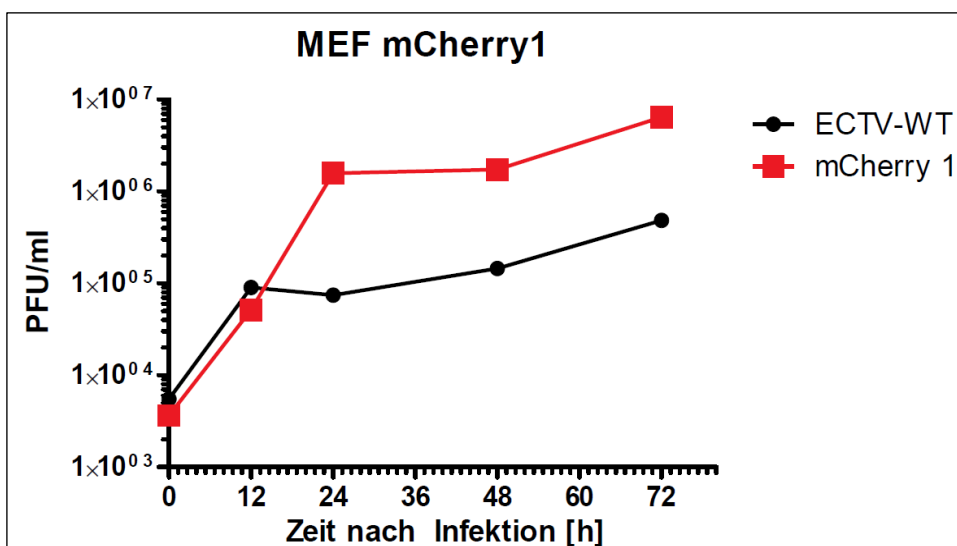


Abbildung 43: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 1 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MEF-Zellen, Infektion mit 0,05 PFU

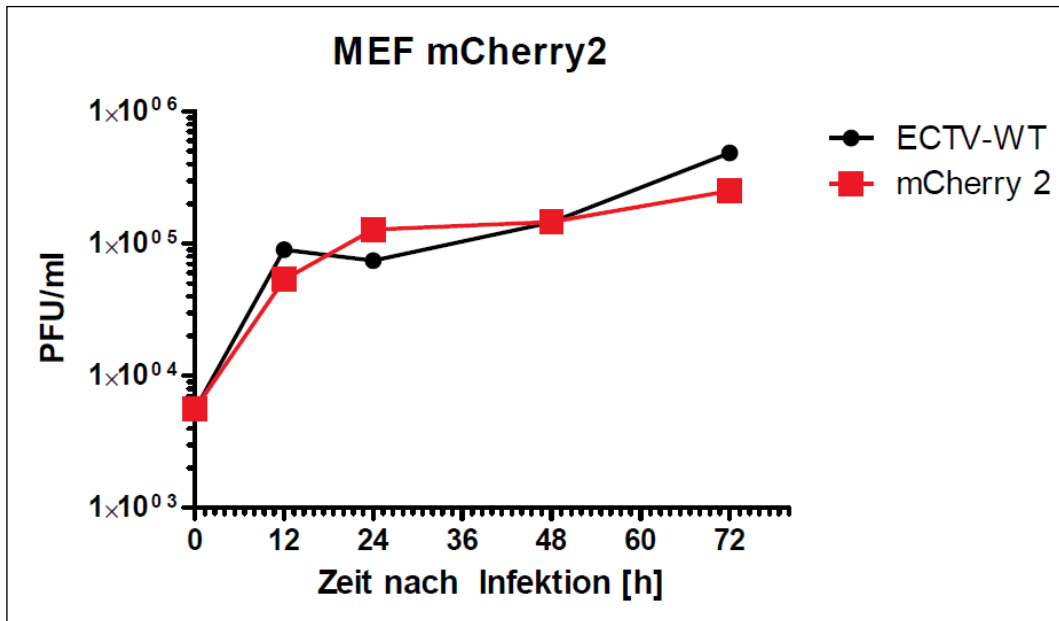


Abbildung 44: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MEF-Zellen, Infektion mit 0,05 PFU

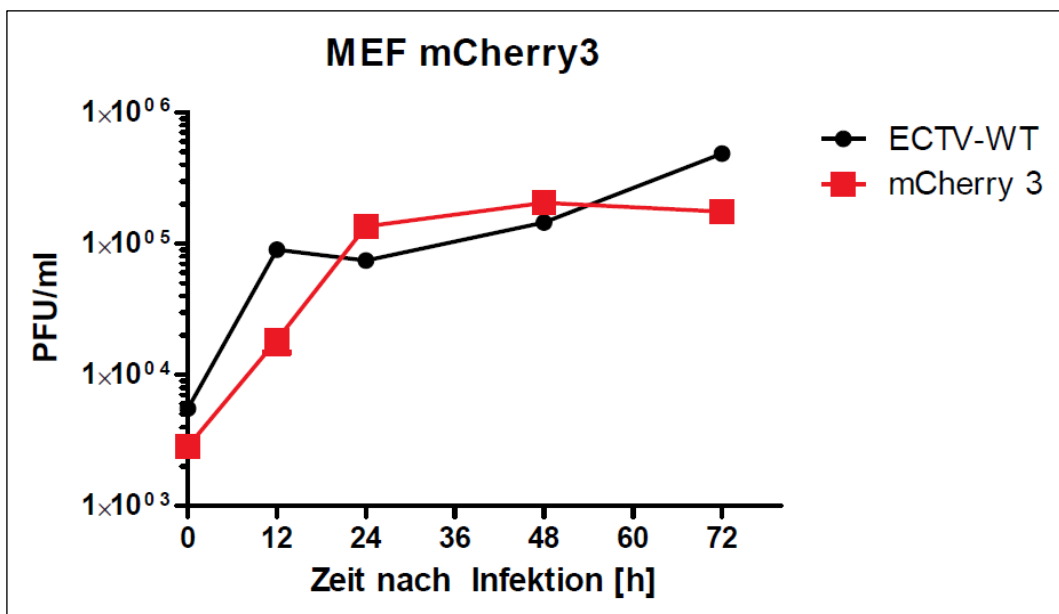


Abbildung 45: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 3 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MEF-Zellen, Infektion mit 0,05 PFU

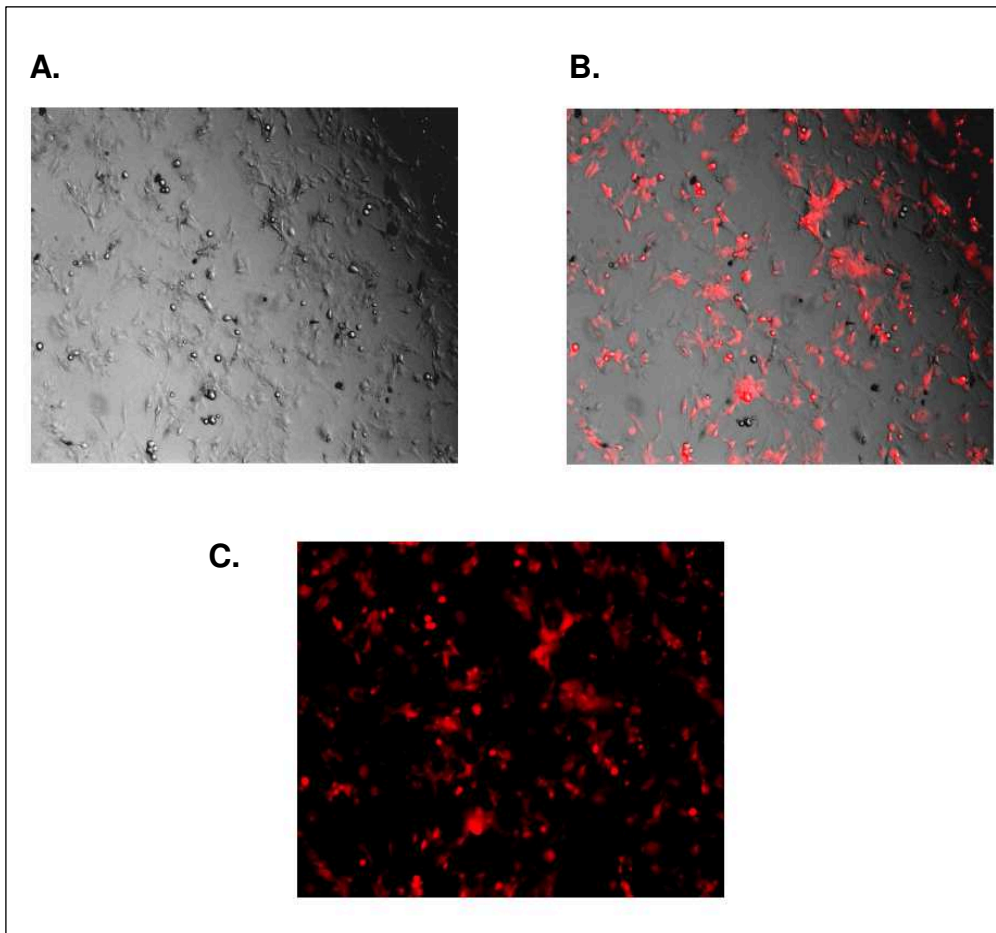


Abbildung 46: Ektromelie-mCherry-Virus 1 24 Stunden nach der Infektion auf MEF-Zellen, A= Phasenkontrastmikroskopie. B= Phasenkontrastmikroskopie mit Überlagerung mCherry-Fluoreszenzkanal C= Fluoreszenzmikroskopie mit mCherry-Filter, Vergrößerung = 40x

Neben der Kontrolle ob das mCherry-Protein innerhalb des Viruslebenszyklus in den MEF sichtbar exprimiert wird, ermöglichte diese Untersuchung auch die Beurteilung der Plaquemorphologie rekombinanter Ektromelie-mCherryviren in dieser Zellkultur. Hierzu wurden MEF mit einer MOI von 0,05 PFU der *rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren 1, 2 und 3* infiziert und die infizierten Kulturen in regelmäßigen Abständen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Abbildung 46 verdeutlicht, dass auch in dieser Zelllinie eine ausgeprägte rote Fluoreszenz erkennbar war. Der zytopathische Effekt auf MEF unterscheidet sich deutlich von den in den MA-104-Zellkulturen beobachteten Veränderungen. Im Gegensatz zu den einzelnen Infektionsherden in MA-104-Monolayern, standen bei der Infektion von MEF sehr ausgeprägte, großflächige Veränderungen mit starker Synzytienbildung im Vordergrund.

Um den Infektionsphänotyp der rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren ausführlicher zu charakterisieren, sollten noch andere in der Maus vorkommende Zelltypen untersucht werden. MEF gehören mit ihrem mesenchymalen Ursprung zu den Zellen, die das Bindegewebe bilden. Im Gegensatz dazu bilden Makrophagen-ähnliche bzw. –abgeleitete Zellen eine andere Gruppe von Wirtszellen, deren Empfänglichkeit für die Ektromelievirusinfektion genauer überprüft werden sollte. Dazu diente die Analyse der in Lunge vorkommenden alveolären Makrophagen. Hierzu wurden MH-S-Zellen verwendet, eine von alveolären Mausmakrophagen abstammende etablierte Zelllinie. Die Abbildungen 47 bis 49 zeigen die Ergebnisse der Mehrschrittwachstumsanalyse auf MH-S-Zellen. Hier konnte beim Ektromelie-mCherry-Virus 1 und dem Wildtyp-Virus eine gleichartige Kinetik der Virusvermehrung beobachtet werden. Nach einer relativ langsamen Replikation während der ersten 24 Stunden und einem Anstieg der Infektiösität um zirka eine Log₁₀-Stufe auf 1×10^5 PFU/ml folgte eine Phase geringfügigen Wachstums bis zum Ende des Experimentes nach 72 Stunden (siehe Abbildung 47). Die Untersuchung der rekombinanten Viren Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-mCherry-Virus 3 ergab jedoch deutlich verminderte Vermehrungsraten mit Virustitern, die mit etwa 2×10^4 PFU/ml um fast eine ganze Log₁₀-Stufe niedriger waren als die von Ektromelie-mCherry-Virus 1 und Ektromelie-Wildtyp erreichte Infektiösität. Hierbei zeigte das Ektromelie-mCherry-Virus 2 das geringste Wachstum. Dennoch ließ sich über den zeitlichen Verlauf auch bei den rekombinanten Viren Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-mCherry-Virus 3 eine eindeutige Steigerung der Virusmenge von zirka 6×10^3 PFU/ml auf 3×10^4 PFU/ml erkennen (siehe Abbildung 48-49).

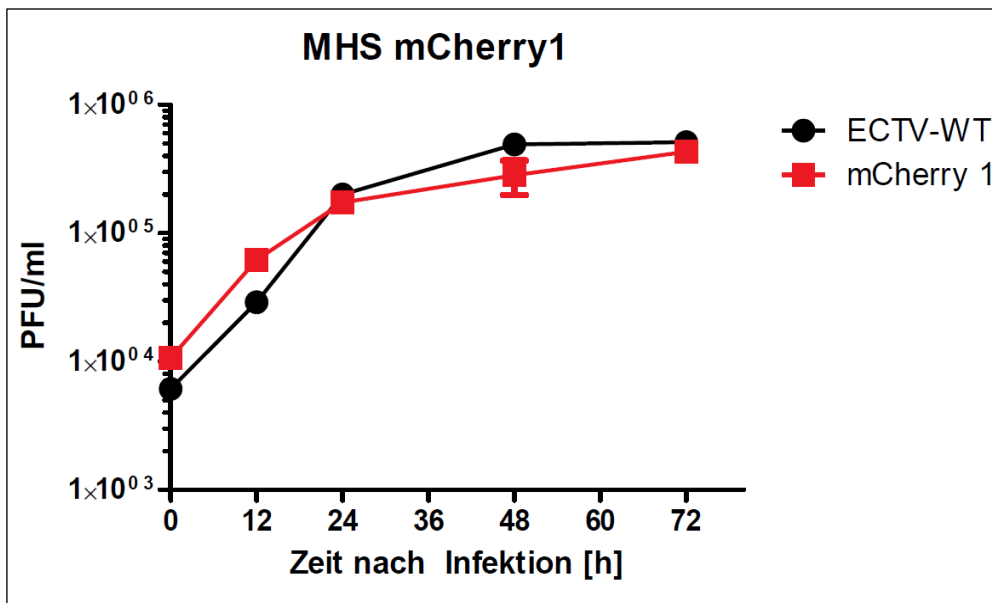


Abbildung 47: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 1 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MH-S-Zellen, Infektion mit 0,05 PFU

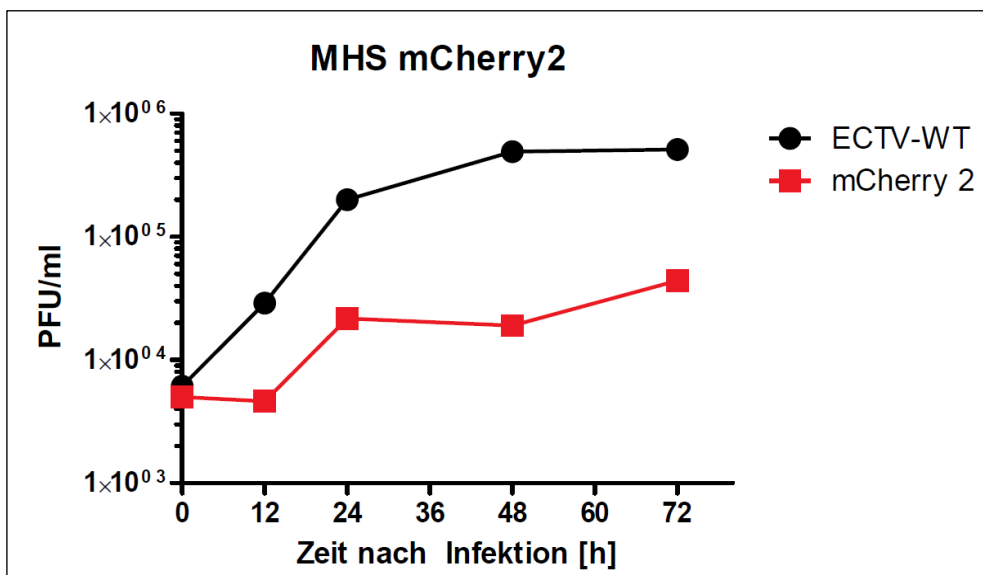


Abbildung 48: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MH-S-Zellen, Infektion mit 0,05 PFU

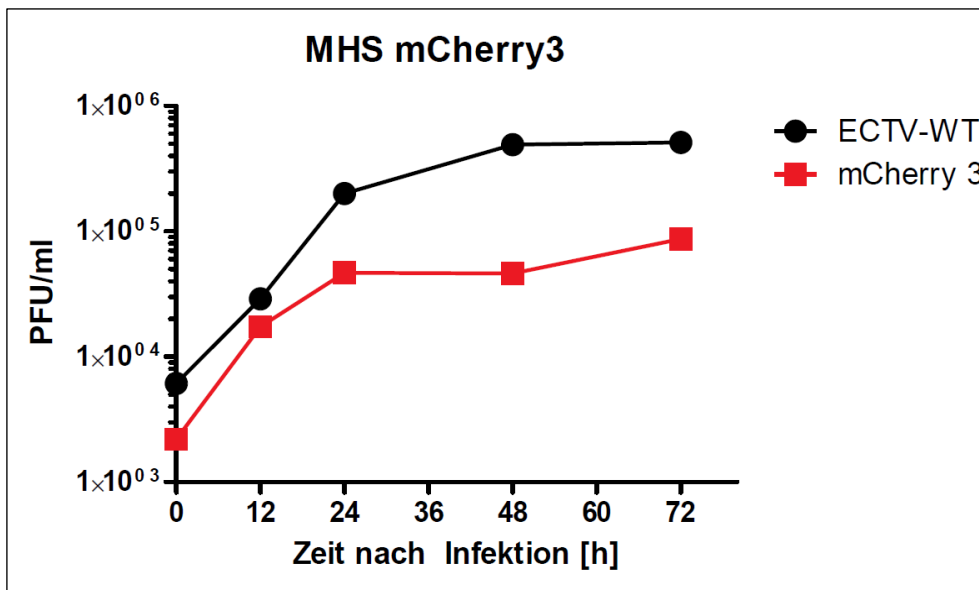


Abbildung 49: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 3 und Ektromelie-Wildtypvirus auf MH-S-Zellen, Infektion mit 0,05 PFU

Die Wachstumsanalyse deckte deutliche Unterschiede im Replikationsvermögen der rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren in MH-S-Zellen auf. *Ektromelie-mCherry-Virus 2* und *Ektromelie-mCherry-Virus 3* vermehrten sich weniger effizient als das rekombinante Virus *Ektromelie-mCherry-Virus 1*. Um sicherzustellen, dass bei allen drei rekombinanten Viren trotz dieser Unterschiede in der Replikationskompetenz die durch den späten P11 Promotor regulierte mCherry Expressionskassette auch transkribiert wird, wurden infizierte MH-S-Zellen mittels des Fluoreszenzmikroskops auf mCherry-Synthese untersucht. Wie Abbildung 50 beispielhaft zeigt, konnten 24 Stunden nach der Infektion mit allen rekombinanten Viren zahlreiche Zellen mit mCherry spezifischer Fluoreszenz detektiert werden.

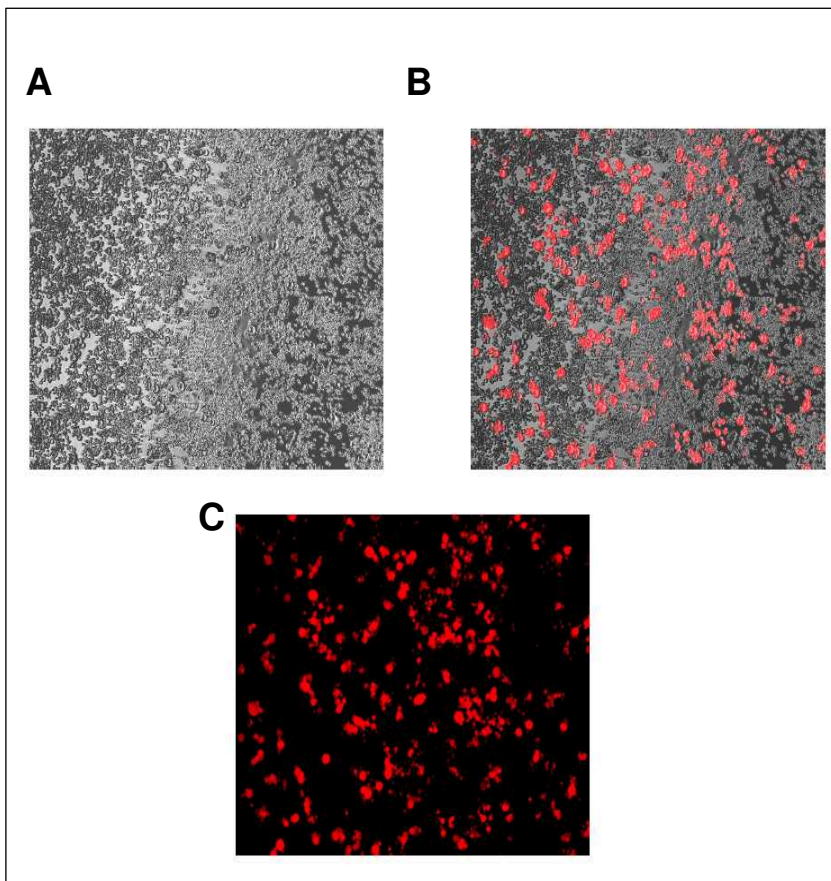


Abbildung 50: Ektromelie-mCherry-Virus 1 24 Stunden nach der Infektion auf MH-S Zellen, A= Phasenkontrastmikroskopie B= Phasenkontrastmikroskopie mit Überlagerung mCherry-Fluoreszenzkanal C= Fluoreszenzmikroskopie mit mCherry-Filte, Vergrößerung = 40x

3.4. Wachstumsanalyse und rekombinante Genexpression in primären Milz- und Knochenmarkszellen der Maus

Die Ergebnisse aus Untersuchungen in kultivierten permanenten Zelllinien sind nicht exakt auf die Situation *in vivo* in der Maus zu übertragen. Dies liegt zum einen daran, dass diese Zellen mit künstlichen Nährmedien und künstlichen Zusätzen kultiviert werden, aber zum anderen auch an Veränderungen in Verhalten und Morphologie der Zellen, die vor allem nach hohen Passagezahlen der Zelllinien auftreten. Zur besseren Beurteilung der in permanenten Zellkulturen erhaltenen Ergebnisse sollte die Wachstumskompetenz der drei rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren im Vergleich zum Ektromelie-Wildtyp-Virus auf primären Mauszellen definiert werden. Mögliche Replikationsdefizite der rekombinanten Viren können in solchen Studien noch besser ausgeschlossen werden. Seit vielen Jahren ist die

Milz als ein zentrales Zielorgan für generalisierende Infektion des Ektromelievirus bekannt. Der Milz kommt somit vermutlich eine herausragende Bedeutung bei der Pathogenese der Mäusepocken zu. Daher erschien es wünschenswert, die Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der hier neu etablierten rekombinanten Viren auch auf die Infektion von primären Milzzellen zu erweitern.

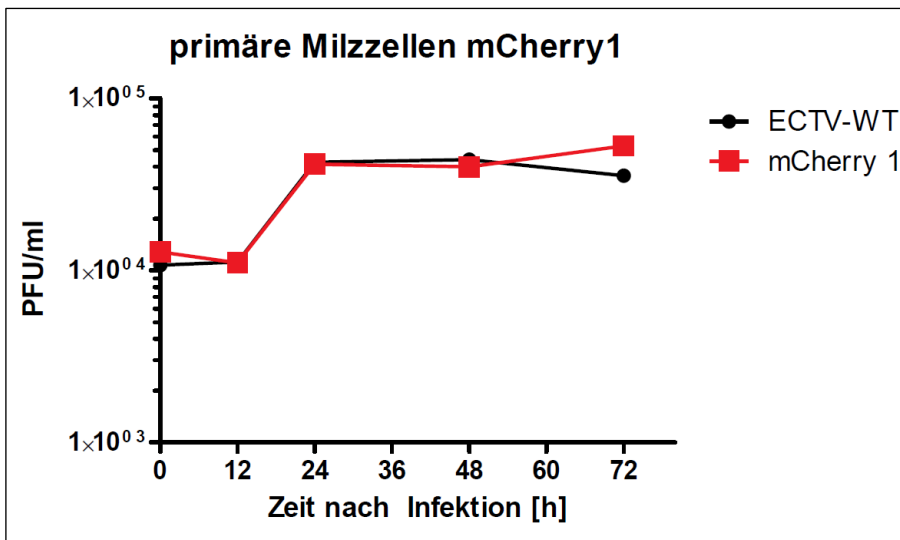


Abbildung 51: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 1 und Ektromelie-Wildtypvirus auf primären Mausmilzzellen, Infektion mit 0,05 PFU

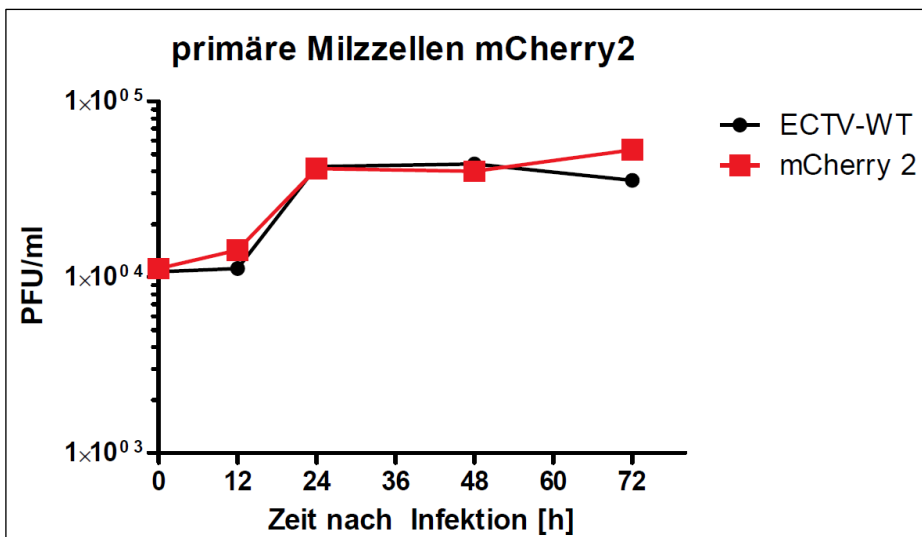


Abbildung 52: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-virus 2 und Ektromelie-Wildtypvirus auf primären Mausmilzzellen, Infektion mit 0,05 PFU

Wie in, Abbildung 51 bis 53 dargestellt ist, konnten die Mehrschrittwachstumsanalysen lediglich eine mäßige Vermehrung der Viren über den Verlauf von 72 Stunden nachweisen. Die Kurven zeigten bei allen Viren eine

Zunahme der Infektiösität von nicht einmal einer Log10-Stufe. Das Ektromelie-mCherry-Virus 3 wurde hierbei offensichtlich mit einem vergleichsweise etwas zu niedrigeren Ausgangstitel eingesetzt, zeigte aber im Infektionsverlauf einen sehr ähnlichen Anstieg der erreichten Virusmenge (siehe Abbildung 53).

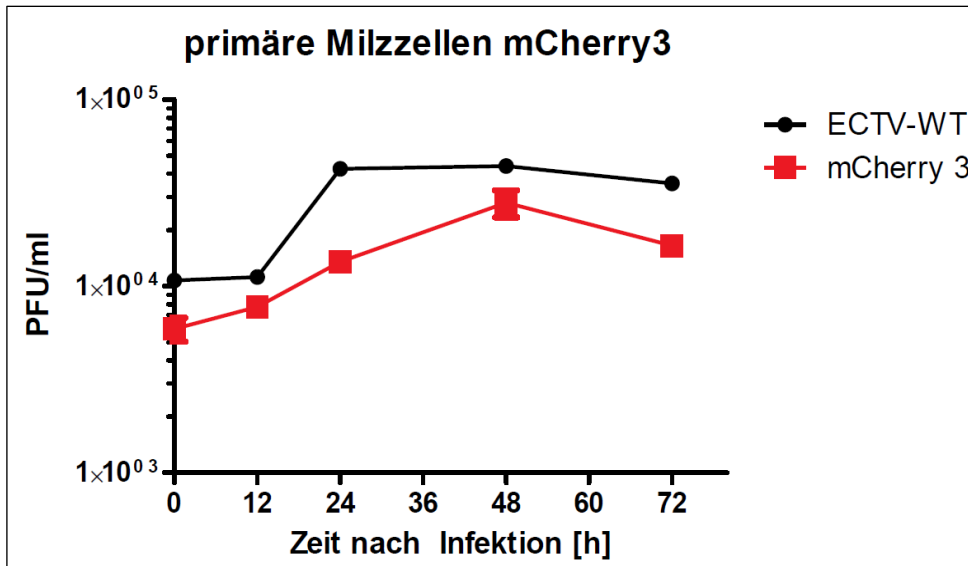


Abbildung 53: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 3 und Ektromelie-Wildtypvirus auf primären Mausmilzzellen, Infektion mit 0,05 PFU

Trotz dieser eher geringen Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Viren und auch des nicht rekombinanten Wildtyp-Virus, konnte bei der mikroskopischen Untersuchung infizierter Milzzellen die Produktion von mCherry mittels Fluoreszenz gut nachgewiesen und weiter beurteilt werden. Hierbei war beginnend ab 24 Stunden nach Infektion ein Maximum an rot leuchtenden Zellen sichtbar, wobei innerhalb der Zellpopulation bis zum Ende des Experimentes nach 72 Stunden immer noch offenbar nicht infizierte Zellen zu identifizieren waren, die keine rote Fluoreszenz zeigten.

Eine Reihe von experimentellen Studien beschreibt die Empfänglichkeit verschiedener Zellkulturen, vornehmlich permanenter Zelllinien, für die *in vitro* Infektion mit Ektromelievirus. Dagegen fehlt es immer noch an konkreten Daten über spezifische Zielzellen der Virusvermehrung im natürlichen Wirtstier Maus. Unter Beachtung der gültigen Pathogenesemodelle für die Ektromelie-Erkrankung und der verschiedenen natürlichen Eintrittswege der *in vivo* Infektion wird vermutet, dass Makrophagen potentiell

le Wirtszellen des Virus darstellen. Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen auf MH-S-Zellen sprachen nicht gegen eine solche Hypothese, so dass in weiteren Experimenten die Replikationskompetenz der rekombinanten Ektromelieviren im direkten Vergleich zum wildtypischen Virus auf frisch etablierten Kulturen von Mausmakrophagen evaluiert wurde. Die Differenzierung der primären Makrophagen gelang durch eine sieben-tägige Stimulation primärer Knochenmarkszellen durch Zusatz von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF) im Kulturmedium. Vor Beginn der Wachstumsanalysen wurden die so differenzierten Zellpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht und qualitativ kontrolliert. Abbildung 54 zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer solchen FACS-Analyse. Bei Immunfärbung des CD11b Markers mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten Antikörper war eine einheitliche für das CD11b-Oberflächenantigen positive Zellpopulation erkennbar (A, schattierte Kurve). Dagegen konnten in den Kulturen keine CD3 bzw. Ly6C positiven Zellpopulationen nachgewiesen werden (B, C). Dieses Bild sprach für eine relativ homogene Zusammensetzung der Kulturen aus Makrophagen- bzw. Monozyten-ähnlichen Zellen sowie eher für die Abwesenheit von signifikanten Populationen von T Zellen, B Zellen oder NK- bzw. NKT-Zellen.

Nach der Qualitätskontrolle durch FACS-Analyse wurden die Kulturen der erhaltenen Mausmakrophagen für Infektionen zur Mehrschrittwachstumsanalyse eingesetzt. Nach vierundzwanzig Stunden Infektion zeigten alle Viren eine Steigerung der Ausgangsvirusmenge um eine Log₁₀-Stufe auf 1×10^5 PFU/ml (siehe Abbildung 55 bis 57). Bemerkenswert war, dass sich das Ektromelie-mCherry-Virus 1 auch in dieser primären Kultur effizienter zu vermehren schien als die anderen Viren und einen Endtiter von etwa 3×10^5 PFU/ml an Infektiosität erreichte (siehe Abbildung 55). Grundsätzlich zeigten sich bei den Untersuchungen in den primären Makrophagen aber keine substantiellen Unterschiede in der Vermehrungsfähigkeit aller rekombinanten Ektromelieviren im Vergleich zum Wildtyp-Virus.

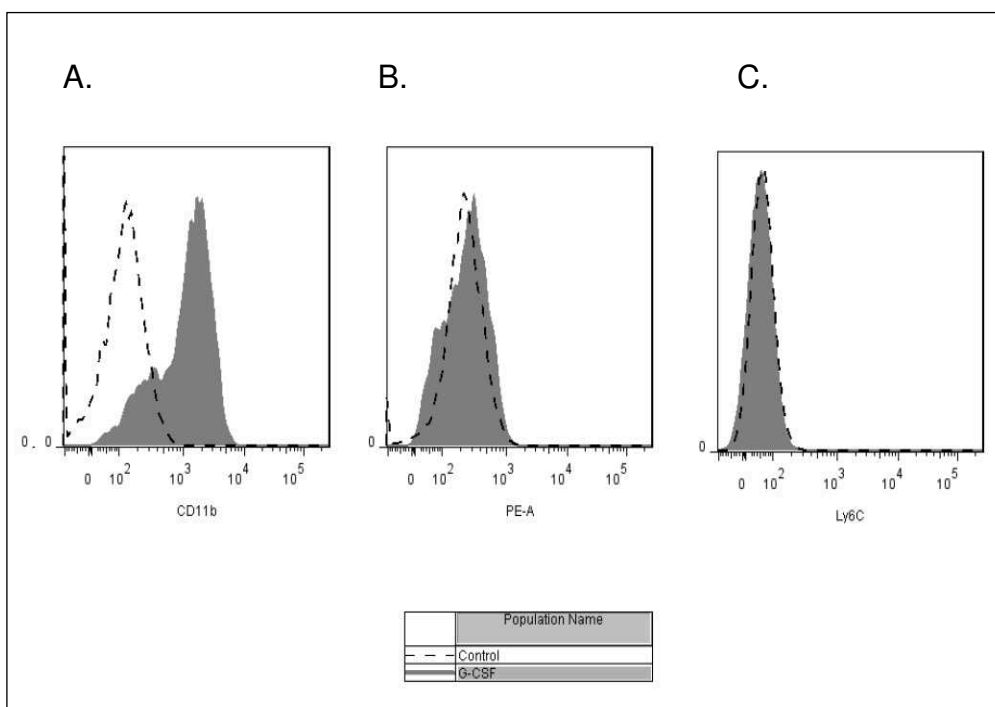


Abbildung 54: FACS-Analyse der primären Knochenmarkszellen nach 7-tägiger Stimulation mit G-CSF, A= CD11b-FITC-Antikörper, B= CD3-PE-Antikörper, C= Ly6C-APC-Cy7-Antikörper

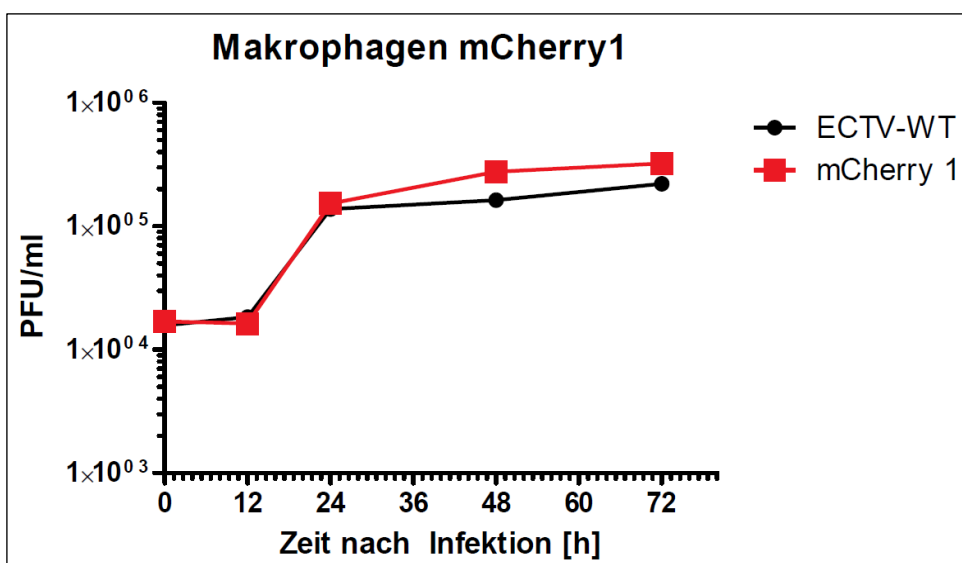


Abbildung 55: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 1 und Ektromelie-Wildtypvirus auf primären Mausmakrophagen, Infektion mit 0,05 PFU

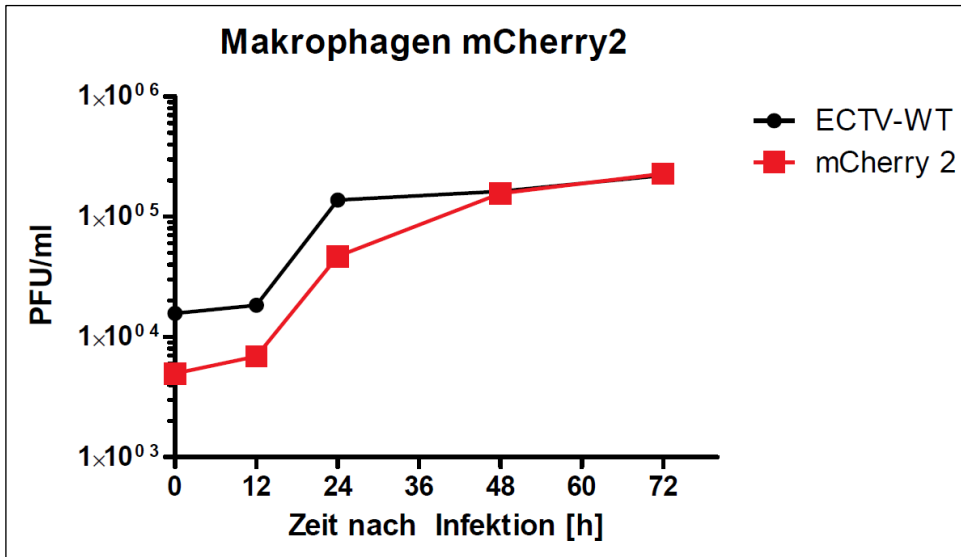


Abbildung 56: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-Wildtypvirus auf primären Mausmakrophagen, Infektion mit 0,05 PFU

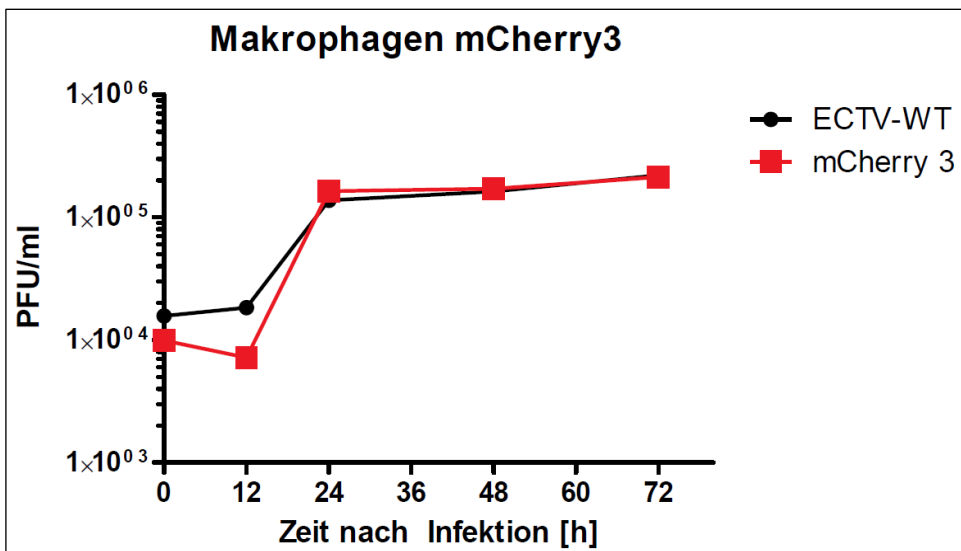


Abbildung 57: Mehrschrittwachstumskurve von Ektromelie-mCherry-Virus 3 und Ektromelie-Wildtypvirus auf primären Mausmakrophagen, Infektion mit 0,05 PFU

Bei der mikroskopischen Analyse der mit rekombinanten Ektromelieviren infizierten primären Makrophagen konnten beginnend 24 Stunden nach Infektion deutlich rot leuchtende Zellen detektiert werden. Im Verlauf der Infektionen war eine Zunahme der Anzahl fluoreszierender Zellen erkennbar und erreichte ein Maximum zu den Zeitpunkten 48 bzw. 72 Stunden nach Infektion. Diese Beobachtungen korrelierten gut mit den Daten aus

den Wachstumskurven und unterstützten die produktive Vermehrung der rekombinanten Ektromelieviren in primären Makrophagen (siehe Abbildung 58).

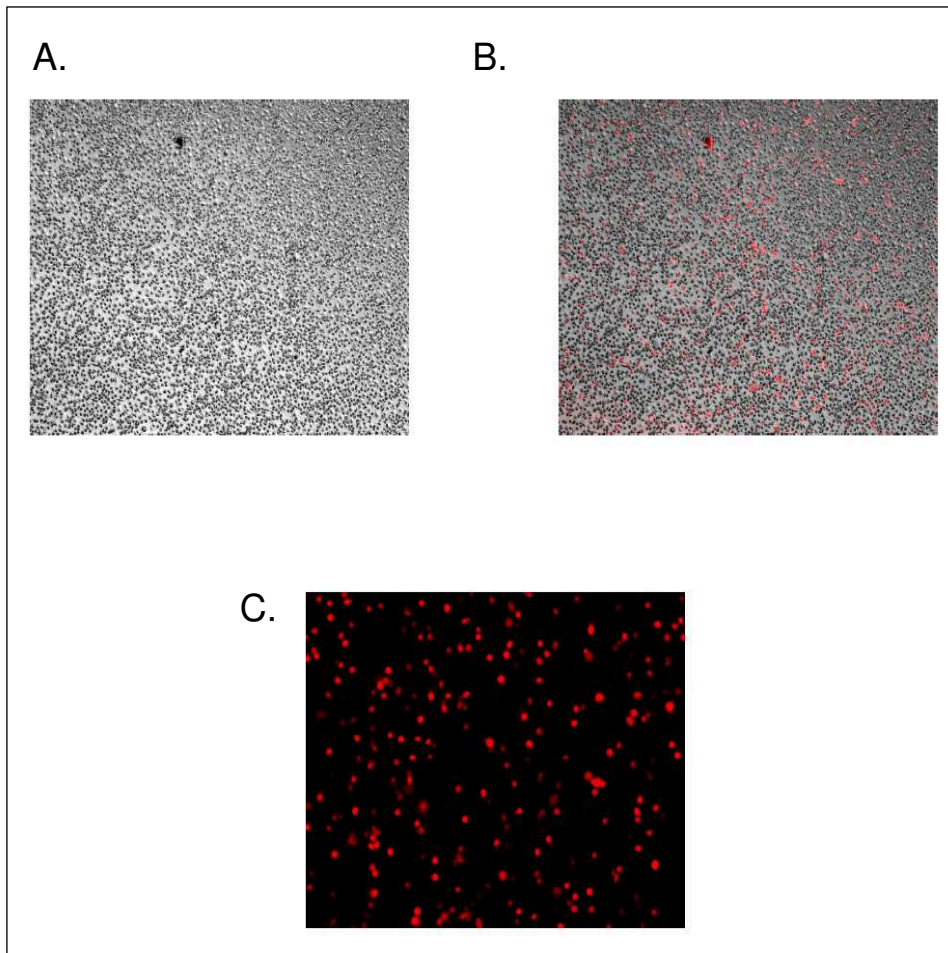


Abbildung 58: Ektromelie-mCherry-Virus 1 24 Stunden nach der Infektion auf primären Mausmakrophagen, A= Phasenkontrastmikroskopie. B= Phasenkontrastmikroskopie mit Überlagerung mCherry-Fluoreszenzkanal C= Fluoreszenzmikroskopie mit mCherry-Filter, Vergrößerung = 40x

V. DISKUSSION

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines fluoreszenzmarkierten Ektromelievirus mit ansonsten unveränderten biologischen Eigenschaften. Dieses rekombinante Ektromelievirus soll in zukünftigen Studien als wertvolles Werkzeug der Biotechnologie die Charakterisierung und Untersuchung der wirtsspezifischen und hochvirulenten Orthopockenviren *in vitro* und vor allem auch *in vivo* verbessern. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente dienten dabei der Bearbeitung folgender Fragestellungen, (i) Identifizierung einer geeigneten Insertionsstelle für Fremdgene im Genom des Ektromelievirus, (ii) Herstellung und klonale Isolierung rekombinanter Ektromelieviren zur Expression der Markergene, (iii) vergleichende Charakterisierung der Vektorviren bei der Fluoreszenz-Markierung virushaltiger Zellen nach *in vitro* Infektion und (iv) vergleichende Charakterisierung der Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren nach *in vitro* Infektion.

Die Ergebnisse der Untersuchungen werden im Folgenden in dieser Reihenfolge diskutiert. Sie sollten erlauben, ein rekombinantes Ektromelievirus zu identifizieren, das sich als Ausgangsbasis für zukünftige Experimente zur Mutagenese von Ektromelieviren und zur *in vivo* Untersuchung der Mäusepockenvirus-Infektion eignet.

1. Identifizierung eines geeigneten Insertionslokus im ECTV Genom

Zur Generierung des neuen fluoreszenzmarkierten Ektromelievirus sollte zunächst ein geeigneter Insertionsort innerhalb des Virusgenoms gefunden werden, der den Einbau und die stabile Expression des Fremdgens ermöglichte. Experimentelle Vorarbeiten zur Herstellung rekombinanter Ektromelieviren dienten der Insertion in funktionelle Genloki, mit dem Ziel diese Gene gleichzeitig zu inaktivieren und deren Funktion genauer zu untersuchen (Alejo et al., 2009; Moulton et al., 2010; Xu et al., 2008). Tabelle 13 beinhaltet eine Übersicht zu den in letzten Jahren konstruierten

rekombinanten Ektromelieviren, bei denen die Markergeninsertion zur Deletion eines anderen funktionellen Ektromeliegens führte (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht zu selektierten rekombinanten Ektromelie Viren

Rekombinantes Ektromelievirus	Genlokus für Insertion	Klonierungsmethode	Referenz
Ektromelievirus Stamm Moskau mit eingebautem Gen für das <i>Zona pellucida-Glykoprotein</i>	Thimidin-kinasegen	Homologe Rekombination	Jackson, Biolog Reprod 1998
Ektromelievirus Stamm Moskau deletiert in EVM166, kodiert Typl Interferon bindendes Protein	EVM166	Homologe Rekombination	Xu, JEM 2008
Ektromelievirus Stamm Naval deletiert in <i>vCD30</i> , kodiert Tumor Nekrose Faktor Rezeptor Homolog	vCD30 Gen	Homologe Rekombination	Alejo, PLoSOne 2009
Ektromelievirus Stamm Moskau deletiert in EMICE Komplex = Ektromelie Virus Inhibitoren von Komplement Enzymen	EVM017	Homologe Rekombination	Moulton JVI 2010
Ektromelievirus Stamm Moskau deletiert in N1L Gen, Inhibitor des NfκB Signalweg bekannt ist	EVM020	Homologe Rekombination	Gratz, JVI 2011

In Anlehnung an eine ursprünglich für das Vacciniavirus entwickelte Insertionsstrategie wurden Fremdgensequenzen auch in den Thymidinkinase-Genlokus des Ektromelievirus eingesetzt (Kochneva et al., 1994). Die Rekombination in den Genort der Thymidinkinase ist eine in der experimentellen Pockenvirologie klassische Strategie zur Einklonierung von Fremdgenen (Schnierle, 2007). Die erste Beschreibung zur Konstruktion rekombinanter Vacciniaviren basiert auf dem Einbau des *Escherichia coli* β-Galaktosidasegens in den Thymidinkinaseort (Weir et al., 1982; Chakrabarti et al., 1985; Mackett et al., 1984). Dieser Genort erschien besonders gut geeignet zur Aufnahme von Fremd-DNA, weil das rekombinante Orthopockenvirus trotz inaktiver Thymidinkinase ein unbeeinträchtigtes Wachstums- und Vermehrungsverhalten aufwies (Weir et al., 1982). Auch über das Genus der Orthopockenviren hinaus hat sich die Thymidinkinase als erfolgreiche Klonierungsstrategie erwiesen, da auch

bei Capripoxviren, Leporipoxviren, Suipoxviren und Avipoxviren der Einbau von Fremdgenen in diesen Genlokus zur Konstruktion vermehrungsfähiger rekombinanter Viren beschrieben sind (Romero et al., 1994; Van Der Leek et al., 1994; Barcena et al., 2000; Kent et al., 2000). Zu beachten in diesem Ansatz ist jedoch, dass es zur einer erheblichen Beeinflussung des Infektionsphänotyps durch den „*Knockout*“ der Thymidinkinase kommt. Hierbei bemerkten Buller und Kollegen bereits 1985, dass Thymidinkinase-negative Orthopockenviren bei der in vivo Infektion deutlich attenuiert sind (Buller 1985). Eine solche Abschwächung der Virulenz ist nicht weiter von Bedeutung, wenn die in vitro Untersuchung der Funktion der eingebrachten rekombinanten Gene die experimentelle Fragestellung dominiert. Die Attenuierung des gentechnisch veränderten Virus ist eventuell sogar wünschenswert, z.B. im Sinne der Laborsicherheit oder in der Entwicklung neuer Impfstoffe. Zur Herstellung eines fluoreszenzmarkierten Ektromelievirus mit ansonsten unveränderten biologischen Eigenschaften, dessen zukünftige Verwendung auch Untersuchungen im wirtsspezifischen Orthopocken-Infektionsmodell ECTV-Maus ermöglichen sollte, war diese zu erwartende Abschwächung der Virulenz nicht wünschenswert. Ein weiterer experimenteller Ansatz bedient sich des Einbaus von Fremdgenen in nichtfunktionelle Bereiche des Virusgenoms. So kann eine unbeabsichtigte Insertionsmutagenese der originären viralen Gensequenzen ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang hat sich die Insertion von Fremd-DNA in im Genom des Modifizierten Vacciniavirus Ankara natürlich auftretende Deletionsbereiche als effiziente Methode zur Expression rekombinanter Gene erwiesen (Sutter and Moss, 1992; Sutter et al., 1995; Wu et al., 2001). In Analogie sind auch einige wenige (zwei: A52R, K3L) vermutlich nichtfunktionelle Gene im Genom des ECTV Moscow (Esteban and Buller, 2005) bekannt. Zum Beispiel fehlt in der Genkarte des Ektromelievirus das homologe Gen zu dem VACV Copenhagen ORF A52 R, der damit auch für die hier beschriebenen Arbeiten als ein potentiell geeigneter Genlokus zur Insertion rekombinanter DNA in Frage kam. Nach sorgfältiger Überprüfung der entsprechenden Gensequenzen für Ektromelie- und Vacciniavirus stellte sich heraus, dass die beschriebene Unterbrechung des ORF A52R in Ektromelievirusgenom lediglich auf einer Punktmutation, dem Fehlen eines einzigen Basenpaares, beruht. Andere Daten

zur Inaktivierung des Gens liegen noch nicht vor, so dass ein Sequenzierungsfehler nicht sicher auszuschließen war. VACV A52 ist ein intrazelluläres Protein, das vermutlich die Aktivierung der Wirtsimmunantwort einschränkt, indem es die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs durch Bindung verschiedener Rezeptoren verhindert (Graham et al., 2008). Das regulatorische Virusprotein ist daher ein wahrscheinlicher Virulenzfaktor und ein Einbau in ein eventuell funktionstüchtiges Ektromelie-Gen würde somit zur Attenuierung führen. Eine andere Möglichkeit Fremd-DNA in nichtkodierenden Bereichen einzusetzen, ist der Einbau in sogenannte Zwischenengenbereiche. In den Genomen von Orthopockenviren kommt es in der Regel nicht zur Überlappung der Leserahmen einzelner Gene, so dass eine Insertion von Fremdgenen an Stellen mit nicht kodierenden Sequenzen möglich ist. Die genaue Sequenzanalyse des Ektromeliegenoms ließ einen nur wenige (zwei) Nukleotide umfassenden Bereich zwischen dem EVM063-Gen und EVM 064-Gen als besonders geeignet für den Einbau von Fremd-DNA erscheinen. Da die Gene EVM063 und EVM064 in gegensätzlicher Orientierung in Richtung auf den Zwischenengenbereich abgelesen werden, kann ausgeschlossen werden, dass eine Insertion die Funktion anderer wichtige Strukturen, wie zum Beispiel Promotoren, zerstört. Der Zwischenengenbereich homologer Gene wurde bereits als Insertionsort für rekombinante HIV-1 Gensequenzen beschrieben (Wyatt et al., 2009). Die von den entsprechenden Vacciniavirus-Genen G1L und I8R kodierten Enzyme sind essentiell für die Replikation viraler DNA (Ansarah-Sobrinho and Moss, 2004; Bayliss and Smith, 1996) und Mutationen in diesen Gensequenzen führen zur Inhibition der Virusvermehrung. Daher erschien dieser Genort besonders geeignet für eine stabile Insertion eines Fluoreszenzmarkers in das Genom des Ektromelievirus. Datenbankrecherchen zeigten, dass die für Vacciniavirus MVA beschriebenen Gensequenzen hoch konserviert im Ektromeliegenom vorliegen. Der Vergleich der Sequenzen für Ektromelie-EVM064 und dem Vacciniavirus I8R Gen ergab eine 96 %ige Homologie und zwischen dem Vaccinia-G1L und Ektromelie-EVM063 konnte sogar eine 98 %ige Übereinstimmung festgestellt werden. Daher wurde in Anlehnung an das MVA-Vektorplasmid pLW-73 das neuartige Transferplasmid pECTV_mCherry konstruiert und nach Überprüfung der richtigen Anordnung der einzelnen Bausteine in der

Restriktionsanalyse des Vektors zur Transfektion Ektromelievirus-infizierter Zellen verwendet. Die Expression des inserierten Fluoreszenzgens zeigte sich kurze Zeit später durch die deutlich wahrnehmbare Fluoreszenz der transfizierten Zellen und bestätigte die Funktionstüchtigkeit der Expressionskassette. Darüber hinaus belegten die nachfolgenden Plaquepassagen, dass rekombinante Ektromelieviren mit unbeeinträchtigter Vermehrungsfähigkeit hergestellt werden konnten und bestätigten, dass der Zwischengenloкус EVM063-EVM064 über die Fluoreszenzmarkierung hinaus als geeignete Stelle zur Insertion von heterologer DNA in das Ektromeliegenom verwendet werden kann .

2. Herstellung und klonale Isolierung rekombinanter Ektromelieviren zur Expression von Markergenen

Zur Markierung von Viren gibt es eine Vielzahl verschiedener Möglichkeiten. Eine Variante ist der Einbau des *E. coli lacZ* Gens in das virale Genom (Norton and Coffin, 1985). *LacZ* kodiert für das Enzym β -Galaktosidase, das die Hydrolyse von verfügbarem X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid zu Galaktose und dem blauen Farbstoff Indigo katalysiert. Indigo zeigt durch Farbgebung die Transkription des *lacZ*-Gens an und markiert somit die virale Genexpression. Eine andere Strategie verwendet ein *Luciferase*-Gen aus der Qualle *Photinus pyralis* oder dem Leuchtkäfer *Renilla reniformis* als Marker für verschiedene Viren (Rodriguez et al., 1988). Die exprimierte Luciferase kann dann von extern zugegebene Luciferine so spalten, dass bei der Reaktion Energie in Form von Lumineszenz abgegeben wird. Dieses Leuchten ermöglicht dann die Detektion und Nachverfolgung einer produktiven Virusreplikation. Bei beiden Systemen ist die Nutzung der Reportergenfunktion von der Zugabe eines Substrates abhängig. Dies bedeutet einen zusätzlichen experimentellen Schritt, der besonders für die *in vivo* Verwendung solcher markierter Viren im Versuchstier ungünstig ist. Darüber hinaus erfolgt der Nachweis der Virusinfektion „auf indirekte Art“, als dass das Leuchten beziehungsweise der Farbumschlag primär Indikatoren für Enzymreaktionen und erst sekundäre Folge einer viralen Genexpression darstellen. Dagegen bietet

die Ko-Produktion von Fluoreszenzproteinen durch Viren den Vorteil, dass hier nach der Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht die Lumineszenz direkt in Abhängigkeit der viralen Replikation und ohne zusätzliche Substratfaktoren oder Genprodukte entsteht. Darüber hinaus sind die meisten Fluoreszenzproteine stabil und speziesunabhängig, so dass die Markierung mit Fluoreszenzen eine attraktive Möglichkeit zur direkten Verfolgung des Viruslebenszyklus mit nicht invasiven Methoden darstellt, die auch für den *in vivo* Einsatz sehr gut geeignet scheint. Vor allem die Proteine GFP und *enhanced* GFP (eGFP) konnten bereits erfolgreich zur Virusmarkierung verwendet werden (de Vries et al., 2010; von Messling et al., 2004). eGFP ist eine gentechnologisch verbesserte Variante des GFP und ist derzeit das beste verfügbare grün fluoreszierende Protein (Heim et al., 1995; Zhang et al., 1996). eGFP kompensiert einige Nachteile des primären GFP, wie zum Beispiel die im Vergleich zur β -Galaktosidase/X-Gal Färbung deutlich schwächere Intensität bei der Markierung von Zellen aufgrund einer ursprünglich geringeren Spezifität des *gfp* Gens für die Expression in Säugetierzellen. Ein Nachteil bleibt, dass sich die Wellenlängen-Bereiche der eGFP vermittelten Fluoreszenz und einer von bestimmten Zellen emittierten Autofluoreszenz deutlich überlagern. So kann es zu unspezifischen Markierungen von Zellen bzw. Geweben kommen, die vor allem beim Einsatz eines GFP-Reporters *in vivo* zu verfälschten Ergebnissen führen können. Darüber hinaus wirkt sich das schnelle Ausbleichen der GFP-Fluoreszenz, insbesondere nach längerer Bestrahlung mit UV-Licht, limitierend auf eine *in vivo*-Verwendung aus, als dies bei Manipulationen am Tier nicht immer zu vermeiden ist (Zhang et al., 2002). Für die Generierung eines fluoreszenzmarkierten Ektromelievirus, dessen zukünftiger Einsatz auch in der Untersuchung einer generalisierenden Orthopokenvirusinfektion in der Maus liegen soll, ist die Markierung mit eGFP daher nicht optimal geeignet. Im Gegensatz dazu erschien die Verwendung des Fluoreszenzproteins mCherry für diesen Anwendungszweck vielversprechender. mCherry ist die modifizierte Monomer-Variante des originären Proteins DsRed aus *Discomonas*. Es zeichnet sich im Vergleich zu eGFP durch eine größere Stabilität der Fluoreszenz aus, die auch nach länger andauernder Bestrahlung mit ultraviolettem Licht nicht abschwächt (Shaner et al., 2004). Zudem tangiert das von mCherry freigesetzte Licht

mit 610 nm auch eine andere Emissionswellenlänge als die GFP vermittelte Fluoreszenz und liegt damit außerhalb der natürlichen Autofluoreszenz von Zellen, so dass bei einer Analyse nur ein unbeutender Einfluß von Autofluoreszenz zu erwarten ist. Dieser spezifische Emissionsbereich hat zusätzliche positive Auswirkung auf die Verwendung des mCherry im lebendigen Organismus. Mit 610 nm liegt die mCherry Fluoreszenz mehr im roten bis infraroten stabilen Wellenlängenbereich des Lichtes und ermöglicht damit eine bessere Gewebedurchdringung im Vergleich zu Licht niedrigerer Wellenlänge. In diesem Zusammenhang beschreiben Ntziachristos und Kollegen auch die Streustrahlung als wichtigen Faktor, der die in vivo Nutzung verschiedener Fluoreszenz- und auch Luciferasesysteme stark beeinträchtigt (Ntziachristos, 2010; Ntziachristos and Razansky, 2010). Hierbei reicht meist schon ein einziges Streuungsereignis aus, um im entstehenden Bild zu einer massiven Unschärfe zu führen. Mehrere Streuungsevents verstärken sich gegenseitig. Dies ist besonders in den Organen von Bedeutung, die zu hoher Streuung neigen, wie zum Beispiel die Lunge. Zur Optimierung der visuellen Resultate müssen die verwendeten Photonen eine hohe Gewebedurchdringung besitzen. Die Durchdringungstiefe eines Photons ist umso besser je höher die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist. So gibt es mittlerweile auch schon experimentelle Ansätze die natürliche Emission von verschiedenen Luciferase-Systemen so zu modulieren, dass der rote Wellenlängenbereich erreicht wird um so eine stärkere Signalantwort, vor allem in der Lunge zu messen (Loening et al., 2010). Das mCherry Protein, mit seinem Emissionsoptimum bei 610 nm, war daher die beste Wahl zur Markierung des Ektromelievirus unter der besonderen Beachtung, dass die Lunge nach einer intranasalen Inokulation ein wichtiges primäres Zielorgan der Infektion darstellt (Ntziachristos, 2010). In der hier vorliegenden Arbeit erfolgte daher die Insertion einer Expressionseinheit für mCherry in den oben beschriebenen Zwischengenloкус.

Zur bestmöglichen Ausnutzung des in das Ektromeliegenom eingeklonierten mCherry-Gens musste auch die Auswahl des Orthopockenvirus-spezifischen Promotors sorgfältig getroffen werden. Der Promotor hat einen essentiellen Einfluss auf Stärke und Zeitpunkt der Transkription eines

Fremdgens innerhalb des viralen Lebenszyklus. Mehrere natürliche aber auch synthetische Vacciniaviruspromotoren haben sich während der letzten Jahrzehnte bei der Herstellung rekombinanter Orthopockenviren bewährt. Hierbei verwendet man, vor allem zur Entwicklung von Pockenvirusvektorimpfstoffen, den natürlichen früh-späten Promotor P7.5, der bereits 30 min nach der Infektion eine schwache bis moderate Genexpression induziert. Daneben sind aber auch synthetische, früh/späte Vacciniapromotoren, z.B. sP, sPII oder PmH5, häufig eingesetzte Regulationselemente, um eine möglichst starke und während des gesamten Replikationszyklus des Virus andauernde Expression zu induzieren (Chakrabarti et al., 1985; Wyatt et al., 1998; Wyatt et al., 1999). Von Bedeutung für die experimentelle Pockenvirusforschung sind auch Promotoren mit ausschließlich früher Transkriptionsaktivität, wie z.B. Pk1L (Trilling et al., 2009), da deren Funktionstüchtigkeit *in vitro* sowie in für die Virusvermehrung nicht-permissiven Zellen gewährleistet ist. Da frühe Promotoren aber eher schwache Aktivität besitzen, erschien zur Konstruktion eines Fluoreszenz-markierten Ektromelievirus eine auf die frühe Transkriptionsphase begrenzte Fremdgenexpression nicht optimal geeignet. Dagegen ist der strikt späte Promotor P11 (Bertholet et al., 1985) durch eine starke Genexpression charakterisiert, die erst vier bis fünf Stunden nach der Infektion einsetzt. Darüber hinaus besitzt dieser späte Promotor im Vergleich zu ähnlich starken früh/späten Promotoren den besonderen Vorteil, dass das mCherry Markerprotein nur in solchen Zellen synthetisiert wird, die auch die Produktion viraler Strukturproteine unterstützen. Eine durch späte Promotoren vermittelte mCherry-Fluoreszenz markiert daher nur Zellen bzw. Gewebe, in denen ein vollständiger viraler Lebenszyklus ablaufen kann. In der hier beschriebenen Konstruktion wurde daher der späte virale Promotor P11 zur Regulation der Transkription des mCherry-Gens im Ektromelievirus ausgewählt.

Die Herstellung des rekombinanten Ektromelievirus gelang durch den Einbau der mCherry Gensequenzen mittels der altbewährten Methode der homologen Rekombination (Mackett et al., 1984; Moss, 1996). Nachdem die rote Fluoreszenz der mit dem Vektorplasmid transfizierten Zellen bereits die Funktionstüchtigkeit der Expressionskassette gezeigt hatte, be-

stätigte die fortlaufende Passage rekombinanter Viren auf MA-104 Zellen eine erfolgreiche Rekombination in das Virusgenom. In diesem Zusammenhang erwiesen sich die MA-104 Kulturen sehr gut zur Selektion der rekombinanten Ektromelieviren geeignet, als die mit Ektromelievirus infizierten Zellen sich durch die Bildung deutlicher Infektionsherde von den nicht infizierten Zellbereichen abgrenzen ließen. Daher war es relativ einfach möglich, alle typischen Virusplaques innerhalb eines Zellrasens aufzufinden, die durch rekombinante Viren verursachten Foci anhand der roten Fluoreszenz unter ultraviolettem Licht zu identifizieren und von den Wildtypviren zu isolieren. So konnte trotz der zu erwartenden etwa tausendfach höheren Menge an Wildtypvirus (Schnierle, 2007) und der Tatsache, dass keine Selektionsmethode, wie zum Beispiel eine gleichzeitige Herstellung von Mykophenolsäureresistenz (Sutter and Moss, 1992) verwendet wurde, sehr schnell eine Population an mCherry-positiven Ektromelieviren akkumuliert wurde. Wichtig war hierbei, die isolierten „*Plaque-picks*“ für die nächste Passage in möglichst hohen Verdünnungen anzusetzen und MA-104 Zellen anschließend in verschiedenen Ansätzen zu infizieren, um möglichst viele rekombinante Viren in der Plaquepassage weiterzuführen. Nachdem die optische Kontrolle mit dem Fluoreszenzmikroskop implizierte, dass außer den roten Virusplaques keine weiteren nicht leuchtenden Infektionsherde im Zellmonolayer vorhanden waren, musste die Abwesenheit von wildtypischem Virus auch auf molekularbiologischer Ebene evaluiert werden. Hierzu diente die Kontrolle der Gesamt-DNA mit Hilfe der PCR-Reaktion. Spezifisch im Ektromelievirusgenom bindende Oligonukleotide ermöglichten eine sehr sensitive Untersuchung auf eventuell noch vorhandene wildtypische Viren, da die PCR in diesem Fall zur Synthese eines nur 563 bp großen DNA Fragmentes führten. Im Vergleich zu dem spezifisch 1296 bp großen DNA-Fragment aus der Reaktion mit der rekombinanten genomischen DNA der ECTV-mCherry-Viren erfolgte die Amplifikation des kleineren PCR-Produktes klar bevorzugt und schneller. Die hier etablierte PCR ermöglicht daher generell eine sichere Qualitätskontrolle von Stockvirus-Präparationen der in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten mCherry-Viren (siehe Abbildung 20-21).

3. Vergleichende Charakterisierung der Vektorviren hinsichtlich mCherry Synthese nach in vitro Infektion

Nach erfolgter Konstruktion des Ektromelie-mCherry-Transfektionsplasmids wurden drei verschiedene Vektorplasmide zur Transfektion Ektromelievirus-infizierter Zellen ausgewählt. Dieser Dreifach-Ansatz gewährleistete eine gewisse genetische Diversität der zu isolierenden rekombinanten Viren, die im Falle des Auftretens von einzelnen Zufallsmutationen und damit der Selektion eines „defekten“ Virus, die Möglichkeit aufrechterhält auf weitere „unveränderte“ rekombinante Viren zurückzugreifen. Das Auftreten von Zufallsmutationen ist ein relativ seltenes Ereignis (Weir and Moss, 1983) und wird durch die Wahl des oben diskutierten Insertionslokus weiter minimiert (Wyatt et al., 2009). Dennoch können innerhalb der zur Aufreinigung durchgeführten Zellkulturpassagen einzelne Punktmutationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Mögliche Änderungen der Viruseigenschaften durch solche Mutationen können bei der in vitro Charakterisierung der Viren zunächst unerkannt bleiben. Zellkultursysteme stellen mehr oder weniger artifizielle Systeme dar, die die Bedingungen einer in vivo Infektion nie sicher widerspiegeln. Daher war es grundsätzlich von Vorteil drei von unterschiedlichen klonalen Isolaten abstammende, rekombinante Ektromelie-mCherry-Viren (ECTV-mCherry-Virus 1,-mCherry 2,-mCherry 3) zu generieren und diese Viren einer sorgfältigen in vitro Charakterisierung der molekularen Struktur und Kapazität rekombinanter Genexpression zu unterziehen.

Hierbei diente die Western-Blot Analyse der Charakterisierung der mCherry-Synthese im Verlauf des ECTV Infektionszyklus. Zunächst konnte bei allen drei rekombinanten mCherry-Viren die erfolgreiche Expression bestätigt werden, da sich eine 26 kDa große Proteinbande mit einem speziell gegen verschiedene rot fluoreszierende Proteine gerichteten monoklonalen Antikörper (Rottach, 2008) hoch spezifisch nachweisen ließ (siehe Abbildung 31-32). In diesem Zusammenhang ist außerdem die Evaluierung der Regulation der Fremdgenexpression innerhalb des viralen Replikationszyklus von Bedeutung. So wurden weitere Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt, in denen im Verlauf der Infektion auch die Kinetik der

Synthese des Zielproteins mCherry nachgewiesen und geprüft wurde (Abbildung 34 bis 36). Der Nachweis der rekombinanten Proteinsynthese startete bei allen Viren übereinstimmend vier Stunden nach Infektion und zeigte einem deutlichen Anstieg des mCherry Produktes zwölf Stunden nach der Infektion. Die Viren Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-mCherry-Virus 3 zeigen 72 h p.i. die deutlichste mCherry-Bande, so dass eine anhaltende Produktion des Reporterproteins in MA-104 Zellen angenommen werden kann. Ektromelie-mCherry-Virus 1 zeigt dagegen zu diesem Zeitpunkt eine Verminderung der mCherry-Menge. Dieser Befund lässt sich mit dem späten Infektionszeitpunkt erklären, zu dem viele infizierten Zellen bereits verloren gegangen waren und bei der Analyse des mCherrys fehlen. Bestätigt wird dies durch den Nachweis einer ebenfalls verringerten Menge an α -Aktin, welches als Kontrolle für die Menge des untersuchten Zelllysates verwendet wurde. Bemerkenswert ist weiter, dass trotz Unterschiede in der Stärke des mCherrysignals die drei rekombinanten Ektromelieviren eine sehr vergleichbare Kinetik ihrer Proteinexpression über den untersuchten Zeitraum erkennen lassen. Dies unterstreicht eine sehr konstante Regulation durch den bei allen Viren eingesetzten viralen Promotor P11. Die Ursache der unterschiedlichen Bandendicken liegt in der natürlichen Varianz der experimentellen Bedingungen, die neben Pipettierabweichungen auch den Zellmonolayer nicht als zu 100 %ig normierbares System einschließt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die mCherry-Synthese stabil über den gesamten Zeitraum der in vitro Infektion abläuft. Darüber hinaus zeigt die Proteinkinetik, dass die durch den P11-Promotor regulierte mCherry Expression sehr gut mit der Expression des späten VACV Proteins B5 übereinstimmt, welches als Standardprotein für die späte virale Proteinsynthese nachgewiesen wird (Backes et al., 2010; Sperling et al., 2009).

Bei der Entwicklung eines fluoreszenzmarkierten Ektromelievirus ist es neben der oben beschriebenen molekularen Analyse der mCherry-Expression von Wichtigkeit, dass die Synthese auch ausreichend ist, um virusinfizierte Zellen auch mittels Fluoreszenz effizient detektieren zu können. Daher beinhaltete ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit den Nachweis Ektromelievirus-infizierter Zellen verschiedenen Ursprungs mit-

tels Charakterisierung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop. Wichtig in diesem Zusammenhang war vor allem auch, ob sich anhand der Reporterproteinsynthese Unterschiede zwischen den drei Ektromelie-mCherry Viren oder bei der Infektion verschiedener Zellen ergeben. Die Untersuchungen der Infektion der etablierten Zellkulturen MA-104, MEF und MH-S, sowie der primären murinen Milzzellen und Makrophagen zeigten, dass alle rekombinanten Ektromelieviren in der Lage waren, das Reporterprotein mCherry effizient zu produzieren. Unterschiede beim Vergleich der durch die Viren vermittelten Fluoreszenzintensität konnten nicht festgestellt werden. In allen Zellkulturen waren zu multiplen Zeitpunkten nach Infektion deutlich rot fluoreszierende Zellen beziehungsweise wachsende Virusplaques erkennbar. Die Fluoreszenz schien auch nach mehrmaliger Untersuchung im Ultravioletten Licht nicht zu verblassen, so dass die bereits diskutierten, erhofften Vorteile des mCherry-Markerproteins sich bestätigten. Somit lässt sich die Vermutung anstellen, dass auch beim in vivo Einsatz dieses rekombinanten Ektromelievirus eine gute Signalstärke der mCherry Fluoreszenz erreichbar messbar ist, wie es neuere Veröffentlichungen zur Eignung von roten Fluoreszenzproteinen beschreiben (Loening et al., 2010). Interessanterweise konnte in allen untersuchten Zelltypen die Synthese des Markerproteins nachgewiesen werden, was infolge der strikt späten Transkription des mCherry-Gens durch den Promotor P11 als Hinweis auf eine produktive Infektion der Zellen anzusehen ist. Dieses Ergebnis überrascht, da von Makrophagen oder Monozyten abgeleiteten Zellen in der Regel eine abortive Infektion mit Vacciniavirus stattfindet, die zwar eine frühe virale Genexpression aber keine Synthese von späten Strukturproteinen erlaubt (Broder et al., 1994; Kastenmuller et al., 2006).

Affennierenepithelzellen verschiedenen Ursprungs, wie zum Beispiel die Zelllinien BS-C-1 oder MA-104, dienen als Standardzellkulturen zur in vitro Vermehrung von Ektromelieviren (Senkevich et al., 1995). Daher ist das Ektromelievirus bezüglich seines Wachstumsverhaltens in diesen Zellen gut charakterisiert (Erez et al., 2009). Es bot sich daher an die Vermehrungsfähigkeit der Ektromelie-mCherry Viren zuerst auch auf Affennierenepithelzellen zu testen, um etwaige Defizite der rekombinanten Viren aufzudecken. Bereits die vergleichende Sichtung der Infektionsherde auf

MA-104 Zellen im Fluoreszenzmikroskop zeigte die Fähigkeit der Ektromelie-mCherry-Virus 1, Ektromelie-mCherry-Virus 2 oder Ektromelie-mCherry-Virus 3 Viren wie das wildtypische Virus charakteristische Satellitenherde, sogenannte Kometen, zu bilden. Diese Kometenbildung ist ein wichtiger Hinweis auf die uneingeschränkte Produktion infektionstüchtiger extrazellulär behüllter Virionen und damit auf eine effiziente Zell-zu-Zell-Verbreitung der Viren (Blasco and Moss, 1992; Blasco et al., 1993). Die Fluoreszenz virusinfizierter Zellen war hierbei deutlich früher zu erkennen als die typischen zytopathischen Veränderungen nach Infektion (siehe Abbildung 37-39). Die mCherry-Markierung zeigt somit die Anwesenheit eines aktiv replizierenden Ektromelievirus vor der Veränderung der Zellmorphologie an und spricht für einen „diagnostischen“ Einsatz des Ektromelie-mCherry Virus zum Erhalt einer schnellen Aussage, ob ein Zelltyp bzw. Gewebe empfänglich ist für die Ektromelievirusinfektion oder nicht.

4. Vergleichende Charakterisierung der Replikationsfähigkeit der rekombinanten Viren nach in-vitro-Infektion

Nachdem in den vorherigen Untersuchungen zur Charakterisierung der Ektromelie-mCherry Viren die gezielte Analyse der mCherry-Proteinexpression im Vordergrund stand, sollte nun der Einfluss dieses Markerproteins auf den viralen Lebenszyklus analysiert werden. Hierbei weisen Abweichungen des bekannten Verhaltens auf Veränderungen im Virusgenom hin. Die sorgfältige Analyse des Wachstumsverhaltens in Zellkultur im direkten Vergleich zum Wildtyp-Virus ist somit ein sehr wichtiger Untersuchungsparameter zur Einschätzung der biologischen Kompetenz eines neuen rekombinanten Virus. Die Literatur beschreibt eine Vielzahl verschiedener Zellen, die mit Ektromelie-Wildtyp Virus infizierbar sind. So sind Zellen aus Affen, Mäusen, Schweinen, Menschen und auch Hühnerembryofibroblasten permissiv für die Ektromelieinfektion. Dagegen konnte in Hamster- und Kaninchenzellen kein produktives Wachstum nachgewiesen werden (Chen et al., 1992). In den hier beschriebenen Untersuchungen sollten insbesondere Daten zum Wachstumsverhalten des

Virus auf Zellen murinen Ursprungs erhoben werden, da das Ektromelie-mCherry-Virus auch der in vivo Untersuchung der Virus-Wirt-Interaktion im Ektromelievirus-Maus-Infektionsmodell dienen sollte. Eine Evaluierung der Vermehrungsfähigkeit auf Zellen anderen Ursprungs, wie zum Beispiel vom Schwein oder dem Menschen, ist von Bedeutung, wenn rekombinante Pockenviren zur Impfstoffentwicklung eingesetzt werden sollen und eine Replikationsdefizienz eines Kandidatvirus mit Attenuierung einhergeht (Sutter and Moss, 1992; Tartaglia, 1992). Die Bewertung der Vermehrungsfähigkeit von Orthopockenviren erfolgt meist mit Hilfe der Mehrschritt-Wachstumsanalyse. Diese Untersuchungsmethode ist besonders vorteilhaft, da neben der Quantifizierung neugebildeter infektiöser Viruspartikeln auch die Fähigkeit der infektiösen Viruspartikel evaluiert wird, sich in dem Monolayer von Zelle zu Zelle auszubreiten (Staib, 2004).

Mit den MA-104-Zellen wurde zunächst eine Zelllinie analysiert, die wie andere Affennierenepithelzellen, generell sehr gut zur in vitro Vermehrung von Orthopockenviren verwendet werden kann (Chen et al., 1993; Meyer et al., 1999). Im Kontext dieser Arbeit wurde auch die klonale Isolierung der Ektromelie-mCherry rekombinanten Viren auf MA-104 Zellen durchgeführt, obwohl keine detaillierten Daten zur Replikation des ECTV in diesen Zellen vorlagen. Die Ergebnisse der Mehrschritt-Wachstumskurven zeigten jedoch keinerlei Limitationen bezüglich der Vermehrungs- und Ausbreitungsfähigkeit der rekombinanten Viren im Vergleich zum wildtypischen Virus (siehe Abbildung 40-42) und erlaubten einen standardmäßigen Einsatz der MA-104 Linie zur Herstellung von Virusstocks für weitere Untersuchungen. Darüber hinaus zeigte das Ektromelie-mCherry-Virus 1 erfreulicherweise sogar eine etwa 10-fach höhere Wachstumsrate als das nicht-rekombinante Wildtyp-Ektromelievirus (Siehe Abbildung 40). Dieses scheinbar überraschende Ergebnis lässt sich damit erklären, dass das für die Experimente verwendete Ektromelie-Wildtypvirus als eine Population verschiedener Viren vorliegt, deren Wachstumskapazität sich durch einen Mittelwert festlegt. Das klonal isolierte Ektromelie-mCherry-Virus 1 stammt dagegen direkt von einem einzigen Vertreter des Ektromelie-Wildtypvirus mit besonders guter Vermehrungsfähigkeit ab. Dagegen spiegeln sich beim Wachstum der Ektromelie-mCherry 2- und Ektromelie-mCherry 3-

Viren eher die Eigenschaften durchschnittlicher Vertreter des wildtypischen Virus wider.

Mausembryofibroblasten (MEF) sind Zellen primären murinen Ursprungs und gelten somit als besonders geeignet, die Interaktionen eines Virus mit einer authentischen Wirtszelle zu untersuchen. In den letzten Jahren konnten verschiedene Orthopockenvirusgene identifiziert werden, die den Ablauf der Virusinfektion in verschiedenen Wirtszellen beeinflussen (Werden et al., 2008). In wieweit diese viralen Faktoren dafür verantwortlich sind, dass wirtsspezifische Pockenviren, wie das Ektromelievirus, besondere Virulenz bei der *in vivo* Infektion aufweisen ist noch unbekannt. Die hier neu etablierten rekombinanten Ektromelieviren sollen in zukünftigen Studien beitragen, den möglichen Zusammenhang zwischen Wirtszellspektrum und Virulenz besser zu untersuchen und zugrunde liegende molekulare Mechanismen zu identifizieren. Daher war es von außerordentlichem Interesse, die neuen rekombinanten Viren hinsichtlich einer produktiven Infektion in MEF-Kulturen zu prüfen. Die Wachstumsanalysen bestätigten die erhoffte vollständige Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten Ektromelieviren. Im direkten Vergleich zum Wildtyp-Virus konnten keine Hinweise auf eine Wachstumseinschränkung festgestellt werden. Im Gegenteil, interessanterweise zeigte das Ektromelie-mCherry-Virus 1 auch auf den MEF-Zellen eine bessere Vermehrungsfähigkeit als das wildtypische Ektromelievirus (siehe Abbildung 43), so dass eine besondere Eignung dieses rekombinanten Virus für zukünftige *in vivo* Untersuchungen anzunehmen ist. Daten zur Vermehrungskapazität in MEF gelten als wichtig hinsichtlich erster Rückschlüsse auf die Effizienz einer *in vivo* Infektion, da die MEF von primären Fibroblastenzellen der Maus abstammen und Fibrozyten als die primären Wirtszellen im klassischen intrakutanen Infektionsmodell („footpad model“) der Maus mit ECTV angesehen werden (Esteban and Buller, 2005; Fenner, 1949).

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der *in vitro* Infektion sollte mit den alveolären Makrophagen ein anderer Zelltyp murinen Ursprungs auf seine Empfänglichkeit für die Ektromelie-mCherry-Viren untersucht werden. Besonders im Hinblick auf die respiratorische Infektion (intranasale Applikation des ECTV), die aktuell als das beste Infektionsmodell für die

Infektion des Menschen mit Variolavirus gilt (Paran et al., 2009; Parker, 2010), sind diese Zellen besonders interessant für Forschungsarbeiten zur Pathogenese generalisierender Pockenvirusinfektionen. So diskutieren Zaucha und Kollegen den möglichen Beitrag von mononukleären Phagozyten zur systemischen Verbreitung von Affenpockenviren aus der Lunge experimentell infizierter Javaneraffen weiter zu den sekundären Zielorganen (Zaucha et al., 2000). Auch im spezifischen Kontext einer intranasalen Ektromelievirusinfektion vermuten Gratz und Kollegen eine Schlüsselrolle alveolärer Makrophagen als primäre Zielzellen zur Vermehrung und/oder systemischen Ausbreitung der Ektromelieviren (Gratz et al., 2011). Primäre murine alveoläre Makrophagen sind für *in vitro* Infektionsexperimente eher schlecht geeignet, da sich mittels Bronchoalveolärer Lavage lassen sich nur relativ kleine und aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzte Zellpopulationen präparieren lassen. Somit stellen die permanenten von primären Lungenmakrophagen der Maus abstammenden MH-S Zellen ein sehr gutes Modell für *in vitro* Infektionsversuche dar. Mbawuike und Kollegen gelang es 1989 diese Zellen durch Transformation mit Simian Virus 40 (SV40) permanent zu stimulieren, so dass dieses System zusätzlich den Vorteil bietet, dass die Makrophagen aktiviert sind und verschiedene Cytokine, wie zum Beispiel Interleukin 1 β , sezernieren (Mbawuike and Herscowitz, 1989). Die Infektion dieser aktivierten Makrophagen erschien insbesondere vorteilhaft, da Ektromelieviren mit einem intakten Repertoire an immunmodulatorischen Faktoren sich auch in Gegenwart einer primären Immunantwort vermehren können und mögliche genetische Defizite rekombinanter Viren im Vergleich zum Wildtyp-Virus festgestellt werden können. Die Ergebnisse der Mehrschritt-Wachstumsanalysen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Virusklonen. Das Ektromelie-Wildtyp-Virus und Ektromelie-mCherry-Virus 1 vermehrten sich auf den MH-S-Zellen mit gleicher Effizienz. (Siehe Abbildung 47). Dagegen zeigten Ektromelie-mCherry-Virus 2 und Ektromelie-mCherry-Virus 3 beide eine reduzierte Vermehrungsfähigkeit auf MH-S Zellen (siehe Abbildung 48-49). Die im Mehrschritt-Wachstum analysierte Infektiösität wird sowohl durch die intrazelluläre Vermehrungsrate als auch die Fähigkeit zur Zell-zu-Zell-Verbreitung beeinflusst (Smith et al., 2002). Die Verläufe der Wachstumskurven lassen bei dem rekombinanten Virus Ektromelie-

mCherry-Virus 2 eher einen Defekt in der intrazellulären Vermehrung vermuten, während sich das Ektromelie-mCherry-Virus 3 weniger gut von Zelle zu Zelle auszubreiten scheint. Die Replikationsdefizienz der Viren könnte daher unterschiedliche Ursachen besitzen. So wird die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit von Orthopockenviren insbesondere durch die virale Evasion Interferon-assoziiierter Immunabwehrsysteme des Wirtes beeinflusst (Perdiguero, 2009), während die Effektivität der Zell-zu-Zell-Ausbreitung primär auf die Fähigkeit zur Morphogenese und Knospung extrazellulärer Virionen (Roberts and Smith, 2008; Smith et al., 2002) zurückgeht. Hervorzuheben bleibt, dass sich das rekombinante Ektromelie-mCherry-Virus 1 auch bei der Infektion alveolärer Makrophagen durch die unbeeinträchtigte Bildung sowohl extrazellulärer als auch intrazellulärer Virionen auszeichnet (siehe Abbildung 47).

Die Ergebnisse aus den *in vitro* Infektionsversuchen in etablierten Zellkulturlinien ließen das rekombinante ECTV-mCherry-Virus 1 hinsichtlich der Vermehrungskapazität als das vielversprechendste der rekombinanten Viren erscheinen. Etablierte Zelllinien sind jedoch immer auch artifizielle Systeme, so dass Ergebnisse zur Replikationskompetenz nicht notwendigerweise auf die Infektion *in vivo* im Versuchstier zu übertragen sind (Chen et al., 1993). Die Untersuchung der *in vitro* Infektion frisch präparierter, primärer Zellen ist daher eine geeignete Möglichkeit den Bedingungen einer *in vivo* Infektion möglichst nahe zu kommen. In Anlehnung an die bisherigen Ergebnisse und die für Ektromelievirus bekannte Pathogenese wurde die Vermehrungsfähigkeit der neu generierten rekombinanten Ektromelieviren in primären Milzzellen sowie primären Knochenmarksmakrophagen der Maus untersucht.

Die Milz ist ein wichtiges tertiäres Zielorgan des Ektromelievirus bei der generalisierenden Infektion des spezifisch empfänglichen Wirtstieres Maus (Chen et al., 1993; Esteban and Buller, 2005; Fenner, 1949). Dies gilt sowohl nach der intrakutanen Infektion als auch nach der Infektion über den Respirationstrakt. Gratz und Kollegen (Gratz et al., 2011) beschreiben beginnend mit Tag sechs nach der Infektion mit ECTV eine stetig ansteigende Viruslast in der Milz. Ob der Anstieg der Infektösität direkt mit einer Virusvermehrung in den Zellen der Milz einhergeht oder auf der

Einwanderung systemisch zirkulierender infektiöser Viren beruht, ist nicht bekannt. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Mehrschritt-Wachstumsanalysen zeigten sowohl bei dem Wildtyp-Virus als auch bei den rekombinanten Ektromelieviren sehr ähnlich verlaufende Vermehrungskurven. Eine deutliche Steigerung der Infektiosität konnte innerhalb der ersten vierundzwanzig Stunden der Infektion festgestellt werden. Auffallend ist der flache Kurvenverlauf der Vermehrungskinetiken, der eher an den Verlauf einer Einschnitt-Wachstumskurve erinnert. Danach kam es aber offenbar zu keiner weiteren Virusvermehrung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in den primären Milzzellen die intrazelluläre Replikation der Viren normal abläuft, die Bildung extrazellulärer Viruspartikel, das heißt solche die aktiv ausgeschleust und über Pili der Zelle zur nächsten Zelle verbreitet werden, dagegen eingeschränkt oder gänzlich unterbunden ist (Blasco and Moss, 1992; Doceul et al., 2010; Smith et al., 2002). Hierbei könnte es sich um einen direkt mit den Milzzellen assoziierten Defekt der Bildung extrazellulärer ECTV-Virionen handeln. Verschiedene Orthopockenvirusproteine werden für die Bildung extrazellulärer Viruspartikel essentiell benötigt und deren Defekt z.B. durch Mutation führt zu verminderter Infektionseffizienz (Herrera et al., 1998; Roper et al., 1998). Da die Wachstumseinschränkung jedoch bei allen untersuchten Viren auftrat, ist eine solche Ursache sehr unwahrscheinlich. Die hier verwendeten primären Milzzellen repräsentieren eine heterogene Zellpopulation, deren verschiedene Zellen (z.B. B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-, NKT-Zellen, mononukleäre Makrophagen) unterschiedliche Permissivität für die Ektromelievirusinfektion besitzen könnten (Lehmann et al., 2009). Die Beobachtung der Ektromelievirusinfektionen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops schien diese Annahme zu bestätigen. Virusinfizierte Milzzellen waren aufgrund ihrer roten Fluoreszenz deutlich zu erkennen. Auffällig war jedoch, dass offensichtlich nur bestimmte Zellen des Gemisches aus adhärenenten Zellen und Suspensionszellen eine produktive Infektion ermöglichten und bis zum Ende des Experimentes andere Zellen nicht infiziert werden konnten. Die eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit der Ektromelieviren ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Heterogenität der Milzzellpopulation zurückzuführen (siehe Abbildung 51-53).

Als weitere primäre Zellkultur wurden in dieser Arbeit aus Knochenmarkszellen der Maus abstammende Makrophagen verwendet. Wie oben bereits diskutiert, könnten Vertreter der mononukleären Phagozyten bei der Pathogenese systemischer Orthopockenvirusinfektionen eine wichtige Rolle spielen (Gratz et al., 2011; Zaucha et al., 2000). Auch Zellen die von lymphatischen Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen, gelten heute als entscheidende Wirtszellen, für die Entwicklung einer letalen Ektromelievirusinfektion (Fang et al., 2008; Parker et al., 2007; Parker et al., 2008; Zaucha et al., 2000). Dagegen belegen frühe Arbeiten von Cohen und Mitarbeitern mit aktivierten Peritonealmakrophagen lediglich eine abortive Infektion mit Ektromelievirus (Cohen et al., 1984). Die hier erzielten Ergebnisse der Wachstumsanalysen auf den MH-S Zellen, einer von alveolären Makrophagen abstammenden Zelllinie, unterstützten aber die Möglichkeit einer produktiven Ektromelievirusinfektion in diesen Immunzellen. Im Gegensatz zu den organspezifisch spezialisierten der MH-S Zellen stellen die von Knochenmarkszellen abgeleiteten Makrophagen einen weniger stark spezialisierten Zelltyp dar. Zur Isolierung und primären Differenzierung der Makrophagen diente die Stimulation der Knochenmarkszellen mit dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor. Sieben Tage nach der Stimulation bestanden die Kulturen überwiegend aus Makrophagen (Abbildung 54), da nur der gegen das spezifische Makrophagenoberflächenepitop CD11b gerichtete Antikörper in der FACS Analyse ein deutliches Signal anzeigte und die Anwesenheit von T-Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen ausgeschlossen werden konnte (Gordon and Taylor, 2005). Die Analyse des Wachstumsverhaltens auf diesen Zellen bestätigte für die rekombinanten Ektromelie-mCherry-Viren und das Wildtyp-Virus ein sehr ähnliches Replikationsvermögen (Abbildungen 55-57). Nach initialer exponentieller Virusvermehrung, waren zu Zeitpunkten nach 24 h p.i. nur noch geringfügige Steigerung der Infektiösität zu erkennen. Wie bei den Versuchen mit den primären Milzzellen, konnten zwar nach der initialen Infektion neue infektiöse Viruspartikel gebildet werden, eine weitere Ausbreitung der Infektion innerhalb der Zellpopulation fand aber nicht statt. Eine unterschiedliche Permissivität verschiedener Wirtszellen in der Zellpopulation kann daher nicht ausgeschlossen werden, auch wenn die FACS Analysen eine einheitliche Makrophagen-ähnliche Zellpopula-

tion annehmen ließen. Besonders hervorzuheben ist jedoch, dass der Anteil der hier infizierten Makrophagen eine starke rote Fluoreszenz aufwies und daher die Infektion zumindest dieser Zellen auch die Synthese später viraler Strukturproteine ermöglicht und somit die Daten aus der Wachstumsanalyse sehr gut unterstützt. Die attraktive Hypothese, dass Makrophagen-abgeleitete Wirtszellen die Ektromelievirusvermehrung in vivo unterhalten können und insbesondere die Verbreitung des Virus innerhalb des Organismus ermöglichen können, gilt es aber in weiteren Studien zu bestätigen (siehe Abbildung 58).

5. Schlussfolgerung

Die sorgfältige Analyse der hier aufgeführten Ergebnisse erlaubt eine abschließende Bewertung der erhobenen Daten wie folgt:

- (i) Der Bereich zwischen den Genen EVM063 und EVM064 des Ektromelievirus ist ein geeigneter Genomloкус zum stabilen Einbau von Fremdgenesequenzen sowie auch zur Generierung anderer rekombinanter Ektromelieviren zur Bearbeitung neuer Fragestellungen.
- (ii) Das Fluoreszenzprotein mCherry erlaubt eine sehr gute Markierung und Verfolgung eines rekombinanten Ektromelievirus in Kontext eines dynamischen Infektionsprozesses in unterschiedlichen Zellsubstraten. Hierbei sind besonders die Vorteile der etablierten Nachweismethoden des Fluoreszenzreportes hervorzuheben, die durch einfache Anregung im 610 nm Wellenlängenbereich des ultravioletten Lichts gelingt.
- (iii) Die Vermehrungsfähigkeit der rekombinanten, mCherry exprimierenden Ektromelieviren in etablierten und primären Zellkulturen ist zumindest ebenso gut wie die des nicht-rekombinanten Ektromelievirus. In diesem Zusammenhang erscheint das rekombinante Ektromelievirus-mCherry-Virus 1 aufgrund seiner biologischen Eigenschaften besonders gut geeignet für zukünftige Untersuchungen in der Zellkultur und im Versuchstier.

6. Ausblick

6.1. In vivo Infektion

Die Verfügbarkeit eines charakterisierten mCherry-Ektromelievirus eröffnet neue, innovative Untersuchungsmöglichkeiten. In diesem Zusammenhang ist die Analyse der intranasalen Ektromelieinfektion besonders vielversprechend, da dieses Modell derzeit als das beste Labormodell zur Erforschung der Menschenpocken gilt. Über viele Jahre wurde standardmäßig die respiratorische Infektion mit *Vacciniavirus Western Reserve* zur Untersuchung des Variolavirus benutzt. Dieses Modell erforderte jedoch die Applikation großer Mengen an Virus um bei Mäusen zu einer Variolavirus ähnlichen Klinik zu führen, die dann mit einer ausgeprägten Neurovirulenz und schnellen Mortalität assoziiert waren. Hierbei limitierten aber vor allem die massiven pneumonischen Lungenveränderungen die Analysekapazitäten dieser intranasalen Vacciniavirusinfektion. Dagegen repräsentiert das respiratorische Ektromeliemodell ein sehr elegantes Untersuchungssystem, bei dem eine sehr geringe Virusmenge ausreicht, um in der Maus eine letale, systemische Infektion zu induzieren. In Verbindung mit einer innovativen Analytik, wie sie das mCherry-markierte Ektromelievirus bietet, können jetzt völlig neue Einblicke in die Pathogenese einer wirtsspezifischen Orthopockenvirusinfektion erhalten werden. Besonders interessant wird sein die Kinetik der Virusausbreitung nach dem Eintritt in den Organismus nach zu verfolgen, denn dazu gibt es immer noch sehr wenig Informationen. Bis heute ist nicht verstanden wo genau die primäre Virusamplifikation nach der intranasalen Infektion beginnt. Auch viele Fragen nach den primären Zielzellen oder dem Tropismus der systemischen Verbreitung des Virus von der Lunge zu den inneren Organen sind noch ungeklärt. Die einzigartige Möglichkeit die Ektromelie-mCherry-Infektion bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion detektieren und dokumentieren zu können verspricht völlig neue Erkenntnisse bei der Bearbeitung dieser Fragestellungen. Vor allem auch durch Kombination mit anderen etablierten Fluoreszenzuntersuchungssystemen erscheint eine umfassende Beleuchtung des *in vivo* Infektionszyklus des Ektromelievirus möglich. Des Weiteren können die hier erarbeiteten Ergebnisse helfen, die molekulare Basis von Immunmodulation und Virulenz einer systemischen

Orthopockenvirusinfektion besser zu verstehen. Vielversprechende Ansätze schließen dabei die gezielte Inaktivierung verschiedener regulatorischer Gene (siehe Tabelle 14) im Genom des Ektromelie-mCherry Virus ein, um so die *in vivo* Funktion dieser Zielgene zu entschlüsseln. Die hierbei zu erwartenden Erkenntnisse tragen auch zu einem genaueren Verständnis grundlegender Mechanismen der antiviralen Immunabwehr des Wirtes bei und mit solchen Kenntnissen erscheint auch die Entwicklung neuartiger Therapeutika und Impfstoffe möglich.

Tabelle 14 Auswahl immunmodulatorischer Proteine des Vacciniavirus, 1= relative Virulenz der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp-Virus, von voll virulent (+++++) zu avirulent (-); n.d. nicht getestet

Genbezeichnung (VACV Cop)	Funktion	Relative Virulenz bei Deletion des Genes ¹	Referenz
A46R	Inhibition von <i>Toll-like Rezeptoren</i> Signalwegen	++	Stack, JEM 2005
A52R	Inhibition von <i>Toll-like Rezeptoren</i> Signalwegen	++	Malon, JExpBio2005
A53R	Nachahmung des <i>Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptors</i>	+++++	Alcami, JGV 1999
B8R	Nachahmung des <i>Typl Interferon</i> Rezeptors	++	Reading, JImmunol 2003
B15R	Nachahmung des <i>Interleukin-1β-Rezeptors</i>	+++++	Kettle, JGV 1997
B18R	Nachahmung des <i>Typl Interferon</i> Rezeptors	++	Waibler, JVI 2009
C12L	<i>Interleukin-18</i> bindendes Protein	+	Reading, JVI 2003
C21L	Kontrolle des Komplement Systems	++	Isaacs, PNAS 1992
F1L	Apoptoseinhibitor	Nd	Fischer, CellDeath 2006
E3L	<i>dsRNA</i> bindendes Protein	-	Ludwig, JGV 2006
K3L	Nachahmung des eIF2- α	++	Langland, Virology 2002
N1L	Interaktion mit NF- κ B Signalwegs	-	Gratz, JVI 2011

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ektromelievirus, der Erreger der Mäusepocken, wird dem Genus der Orthopockenviren zugeordnet und gehört zu den Vertretern, die nur für einen Wirt virulent sind. Das Ektromelievirus ist spezifisch an die Maus adaptiert und induziert dort eine zyklisch, systemische Infektionskrankheit. An der Ausbildung dieser letalen Erkrankung sind vermutlich eine Vielzahl regulatorischer Virusproteine beteiligt, die sehr genau an das Immunsystem der Maus angepasst sind. Kandidaten für sogenannte *Immunevasionsgene* sind für fast alle Orthopockenviren identifiziert und beschrieben. Aufgrund limitierter Untersuchungsmöglichkeiten ist aber noch sehr wenig über die Funktionen dieser Gene bekannt, vor allem mit welchen Mechanismen die hier kodierten Faktoren agieren, um *in vivo* die Entwicklung eines fatalen Krankheitsverlaufes zu fördern.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen experimentellen Ansatz für die Analyse der Pathogenesemechanismen der Ektromelievirusinfektion *in vitro* und *in vivo* in der Maus zu entwickeln. Die Strategie beruhte auf der Markierung des Ektromelievirus mit einem rekombinanten Gen zur Expression eines Fluoreszenzproteins. Dieser Reporter sollte neue nützliche Einblicke in den Ablauf des Lebenszyklus des Erregers ermöglichen, gleichzeitig sollte das fluoreszenzmarkierte Virus im Vergleich zu nicht rekombinanten Ektromelievirus unveränderte biologische Eigenschaften besitzen. Als Fluoreszenzmarker diente in der hier vorliegenden Arbeit das Protein mCherry, das mit den etablierten Detektionssystemen den bestmöglichen Nachweis virusinfizierter Zellen *in vitro* und *in vivo* ermöglichen sollte. Zunächst konnte zur Generierung eines rekombinanten Ektromelie-mCherry Virus im Genom des Ektromelievirus ein neuartiger Insertionsloкус identifiziert werden. Der Einbau der Fremdgensequenzen in den Zwischengenloкус EVM063 und EVM064 interferierte nicht mit anderen funktionellen Bereichen des Ektromeliegenoms und erlaubte die Herstellung stabiler rekombinanter Ektromelieviren. Die neue Insertionsstelle kann somit in Zukunft auch für die Konstruktion anderer gentechnisch modifizierter Ektromelieviren eingesetzt werden. Nach der erfolgreichen Rekombination des Ektromelie-mCherry Virus wurden drei voneinander unab-

hängige klonale Isolate dieses Virus gewonnen und einer detaillierten Charakterisierung in *in vitro* Infektionsexperimenten unterzogen. Das mCherry Protein erwies sich hierbei als ein ausgezeichnetes molekularbiologisches Werkzeug zur direkten Markierung der Infektion unterschiedlicher Zielzellen mit Ektromelievirus. Jedes der drei untersuchten rekombinanten Ektromelieviren vermittelte eine deutlich sichtbare rote Fluoreszenz infizierter Zellen bereits innerhalb eines einzigen Infektionszyklus (12 Stunden nach Infektion). Zur Prüfung ob Einbau und Expression des Reportergens das natürliche Infektionsverhalten des Ektromelievirus beeinflusst, wurde das Wachstum der drei rekombinanten Ektromelieviren in verschiedenen etablierten Zelllinien und in *in vitro* präparierten primären Mauszellen analysiert. Alle Ektromelie-mCherry-Viren wiesen eine mindestens genau so gute Vermehrungsfähigkeit wie das nicht rekombinante Ektromelie-Wildtypvirus auf. Zudem identifizierten die vergleichenden Untersuchungen das Ektromelie-mCherry-Virus 1 als das Virus mit den besten Wachstumseigenschaften auf permanenten und primären Zellkulturen. Dieses Virus bietet sich daher als eine besonders vielversprechende Ausgangsbasis für die Herstellung von gezielt mutierten Viren und für weitere Untersuchungen in *in vitro* und *in vivo* Infektionsexperimenten an. Mit den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten ist es zum ersten Mal gelungen, rekombinante mCherry-markierte Ektromelieviren zu konstruieren, die in allen untersuchten biologischen Eigenschaften mit einem hoch virulenten Ektromelie-Wildtypvirus übereinstimmen. Die zukünftige Nutzung dieser Viren verspricht völlig neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der Wechselwirkung zwischen einem wirtsspezifischen Orthopokenvirus und seinem natürlichen Wirt. Als Ergebnis erwartet werden dürfen ein umfassenderes Verständnis zur Pathogenese systemischer Virusinfektionen und grundlegende Erkenntnisse zur Funktion der Immunabwehr. Beides sind wichtige Voraussetzungen für die Entwicklung neuer wirksamer Impfstoffe und Therapieansätze.

VII. SUMMARY

Ectromelia virus, the causative agent of mousepox, is an Orthopoxvirus with narrow host specificity and induces a severe systemic disease in mice. The virus encodes multiple regulatory proteins that are generally believed to be involved in the pathogenesis of mousepox. Most likely, these so called *immune evasion factors* are a result of the close adaptation of the virus to its specific host and similar genes have been identified for nearly every Orthopoxvirus. However, the precise molecular functions of the encoded immunomodulatory proteins remain mostly unknown.

Objective of this work was to develop a new experimental system to analyze the underlying mechanisms of the pathogenesis of Ectromelia virus infection in vitro and in vivo. The general approach was based on the construction of recombinant viruses that express fluorescence proteins as promising markers to study the virus life cycle. An important prerequisite was that the key biological properties of these reporter viruses should not differ from those of the ancestor wild-type virus. Thus, we inserted the coding sequences of the fluorescence protein mCherry into the Ectromelia virus genome by targeting the intergenic region between the Ectromelia genes EVM063 and EVM064. This new insertion locus proved to be a highly valuable site to generate stable, replication competent Ectromelia viruses and may be also useful for future engineering of other recombinant viruses. To analyze the biological features of the new recombinant Ectromelia viruses in more detail we obtained three different clonal virus isolates and comparatively characterized their ability to express the mCherry marker protein upon infection of various tissues. Microscopical examination revealed infected cells by bright red fluorescence as early as 12 hours post infection with all viruses. Moreover, when analyzing multiple-step virus growth in primary and established cell cultures the recombinant viruses replicated to levels at least equivalent to those determined for the wildtype Ectromelia virus. Notably, the Ectromelia-mCherry1 virus stuck out by its excellent biological properties infecting primary and permanent cell lines with highest efficiency. Thus, this virus seems to be a particularly promising candidate for use in mutagenesis studies and in vivo infection experi-

ments. Future applications of this model system should help to significantly improve our understanding of systemic disease pathogenesis and virus specific immunomodulation of the host response. This knowledge is believed to be a key requirement for the development of novel poxvirus based vaccines and therapeutics.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Bárcena J, Morales M, Vázquez B, Boga JA, Parra F, Lucientes J, Pagès-Manté A, Sánchez-Vizcaíno JM, Blasco R, Torres JM. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *Journal of Virology* 2000; 74: 1114-23.

Bevis BJ, Glick BS. Rapidly maturing variants of the discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotech* 2002; 20: 83-7.

Campbell EM, Perez O, Melar M, Hope TJ. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. *Virology* 2007; 360: 286-93.

Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99: 7877-82.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263: 802-5.

Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennery P, Stevenson DK, Benaron DA. Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochemistry and Photobiology* 1997; 66: 523-31.

de Vries RD, Lemon K, Ludlow M, McQuaid S, Yüksel S, van Amerongen G, Rennick LJ, Rima BK, Osterhaus ADME, de Swart RL, Duprex WP. In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *Journal of Virology* 2010; 84: 4714-24.

Doer H, Gerlich, WH. (2010) *Medizinische Virologie*, Thieme Verlag.

Fenner F. Mouse-Pox (Infectious Ectromelia of mice): A Review. 1949.

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995; 373: 663-4.

Heim R, Tsien RY. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 1996; 6: 178-82.

Kent SJ, Zhao A, Dale CJ, Land S, Boyle DB, Ramshaw IA. A recombinant avipoxvirus HIV-1 vaccine expressing interferon-gamma is safe and immunogenic in macaques. *Vaccine* 2000; 18: 2250-6.

Lin MZ, McKeown MR, Ng H-L, Aguilera TA, Shaner NC, Campbell RE, Adams SR, Gross LA, Ma W, Alber T, Tsien RY. Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals. *Chemistry & Biology* 2009; 16: 1169-79.

Luker GD, Bardill JP, Prior JL, Pica CM, Piwnica-Worms D, Leib DA. Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *Journal of Virology* 2002; 76: 12149-61.

Luker KE, Luker GD. Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation. *Antiviral Research* 2010; 86: 93-100.

Mahlknecht U, Deng C, Lu MC, Greenough TC, Sullivan JL, O'Brien WA, Herbein G. Resistance to apoptosis in HIV-Infected CD4+ T lymphocytes is mediated by macrophages: Role for Nef and immune activation in viral persistence. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 6437-46.

Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species. *Nature Biotechnology* 1999; 17: 969-73.

McGavern DB, Kang SS. Illuminating viral infections in the nervous system. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11: 318-29.

Parker S. Ectromelia virus infections of mice as a model to support the licensure of anti-orthopoxvirus therapeutics. *Viruses* 2010; 2010: 1918-32.

Parker S, Chen NG, Foster S, Hartzler H, Hembrador E, Hruby D, Jordan R, Lanier R, Painter G, Painter W, Sagartz JE, Schriewer J, Mark Buller R. Evaluation of disease and viral biomarkers as triggers for therapeutic intervention in respiratory mousepox – An animal model of smallpox. *Antiviral Research* 2012; 94: 44-53.

Pierson TC, Diamond MS, Ahmed AA, Valentine LE, Davis CW, Samuel MA, Hanna SL, Puffer BA, Doms RW. An infectious west nile virus that expresses a GFP reporter gene. *Virology* 2005; 334: 28-40.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111: 229-33.

Romero CH, Barrett T, Chamberlain RW, Kitching RP, Fleming M, Black DN. Recombinant capripoxvirus expressing the hemagglutinin protein gene of rinderpest virus: protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease viruses. *Virology* 1994; 204: 425-9.

Rouse BT, Sehrawat S. Immunity and immunopathology to viruses: what decides the outcome? *Nature Reviews Immunology* 2010; 10: 514-26.

Schnierle SS. Recombinant poxvirus vaccines in biomedical research. *Poxviruses*, ed. A. Mercer, A. Schmidt, O. Weber, Birkhäuser Verlag, Basel Switzerland 2007: 311-27.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 2004; 22: 1567-72.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1962; 59: 223-39.

Shimomura O. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters* 1979; 104: 220-2.

Tramier M, Zahid M, Mevel J-C, Masse M-J, Coppey-Moisan M. Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells. *Microscopy Research and Technique* 2006; 69: 933-9.

van der Leek M, Feller J, Sorensen G, Isaacson W, Adams C, Borde D, Pfeiffer N, Tran T, Moyer R, Gibbs E. Evaluation of swinepox virus as a vaccine vector in pigs using an aujeszky's disease (pseudorabies) virus gene insert coding for glycoproteins gp50 and gp63. *Veterinary Record* 1994; 134: 13-8.

von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 14216-21.

Wachter R. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 1998; 15(6): 1276-77.

Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Molecular Therapy* 2001; 4: 297-306.

Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; 227: 707-11.

IX. ANHANG

1. Geräte

Tabelle IX-11: Auflistung der verwendeten Geräte und Hilfsmittel und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank New Brunswick, Galaxy 170 S	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
Cell Stainer-Falcon Filter 70µm	BD- Bioscience, Heidelberg
BD FACS Cantoll	BD- Bioscience, Heidelberg
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick
Geldokumentationssystem, Transilluminator, BioView, UV-light	
Gewebekulturplatten 6, 12, 24, 48, 96 well	Sarstedt Nümbrecht
Immuno-Blot Nitrocellulose Membran, Protran BA 85	Whatman, Dassel
Inkubator	Memmert
Kühlzentrifuge Multifuge 1S-R	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
MicroChemi-Chemiluminescence	Biostep, Jahnsdorf
Mikroskop CKX41-Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Mikroskop Fluoreszenz Axiovert 40 C	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop	Krüss Optronic, Hamburg
Netzgerät Standard Power Pack P25	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
New Brunswick Schüttler U725 Innova	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
New Brunswick Scientific Schüttelinkubator Innova 44	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
PAGE-Apparatur MiniProteanII	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Privileg Mikrowelle 8020	Quelle AG, Fürth
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Germany
Stuart Rollermischer SRT1	Barloworld Ltd., Johannesburg, Süd-Afrika
Tank Blotting-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
Tisch-Kühlzentrifuge Fresco 17	Thermo Electron Corp., Ulm
Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Nürtingen
Thermocycler Peltier, My Research	GRI Lab Care Service
Trans-Blot Transfer Medium NC-Membran 0,2µm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultraschallgerät Sonoplus mit Schallbecher UW2200 und Spitze	Bandelin GmbH & Co.KG, Berlin
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad 1228-2F	Merck KGaA, Darmstadt, Darmstadt
Zellzähler Z1	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2. Kommerziell erhältliche Reagentien, Kits und Standards

Tabelle IX-22: Kommerziell erhältliche Reagentien, Kits und Standards

Bezeichnung	Bezugsquelle
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
DNA-Standards	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzyme, Polymerasen und Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
Super Signal West Duro Extended Duration Substrat	Thermo Scientific, Schwerte
Nitrozellulose-Membran, 0,20 µm	Whatman, Dassel
Nucleo-Spin Extract II	Machery-Nagel, Düren
Nucleo Bond Xtra Midi	Machery-Nagel, Düren
Roche complete, Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Penzberg
Micro BCATM Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Schwerte
X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg

3. Sequenzvergleich der Vacciniavirus MVA Gene mit den Ektromelievirus Stamm Moskau Genen

3.1. Vacciniavirus MVA ORF I8R mit dem Homolog EVM063 des Ektromelievirus Stamm Moskau

Score = 3352 bits (1815), Expect = 0.0 Identities = 1961/2033 (96%), Gaps = 4/2033 (0%) Strand=Plus/Plus				
Query	70074	ATGGAAAAGAATTTACCAGATATCTTCTTTTTTCCAAACTGCGTTAATGTATTCTCTTAC		70133
Sbjct	75749	ATGGAAAAGAATTTACCAGATATCTTCTTTTTTCCAAACTGCGTTAATGTATTCTCTTAC		75808
Query	70134	AAATATTCACAAGATGAATTCAGTAATATGAGTAAAACGGAACGTGATAGTTTCTCATTG		70193
Sbjct	75809	AAATATTCACAAGATGAATTCAGTAATATGAGTAAAACGGAACGTGAAAGTTTCTCATTG		75868
Query	70194	GCCGTGTTTCCAGTTATAAAACATAGATGGCATAACGCACACGTTGTAAACATAAAGGA		70253
Sbjct	75869	GCAGTGTTTCCAGTGATAAAACATAGATGGCATAACGCACACGTTGTAAACATAAAGGA		75928
Query	70254	ATATACAAAGTTAGTACAGAAGCACGTGGaaaaaaGTATCTCCTCCATCACTAGGAAAA		70313
Sbjct	75929	ATATACAAAGTTAGTTTCAAGCGCGTGGAGAAAAAGTATCTCCCCATCACTAGGAAAA		75988
Query	70314	CCCGCACACATAAACCTAACACGAAACAATATATATACAGTGAACACACAATAAGCTTT		70373
Sbjct	75989	CCTGTTTATATAAACCTAACTACGAGGCAATATATATACAGTGAATACAATAAGCTTT		76048
Query	70374	GAATGTTATAGTTTCTAAATGTATAACAATAACAGAAATCAATTCGTTTCGATGAGTAT		70433
Sbjct	76049	GAATGTTATAGTTTCTAAATGTATAACAATAACAGAAATCAATTCGTTTCGATGAGTAT		76108
Query	70434	ATATTAAGAGGACTATTAGAAGCTGGTAAT-AGTTTACAGATATTTTCCAATCCGTAGG		70492
Sbjct	76109	ATATTAAGAGGACTATTAGAAGCTGGTAATCAG-TTACAGATATTTTCCAATCCGTGGG		76167
Query	70493	TAAACGAACAGATACTATAGGTGTACTAGGGAATAAGTATCCATTAGCAAAATCCATT		70552
Sbjct	76168	TAAACGAACAGATACTATAGGTGTACTAGGGAATAAGTATCCATTAGCAAAATCCATT		76227
Query	70553	GGCCTCATTAACTCCTAAAGCACACGAGAGATATTTTCAGCGTGGATTCTCATAGACC		70612
Sbjct	76228	GGCCTCATTAAACCCTAAAGCACACGAGAGATATTTTCAGCGTGGATTCTCATAGACC		76287
Query	70613	TGTAGTTTAACTGGAGGAACCTGGAGTGGGTAAGACGTCACAGGTACCCAAGTTATTGCT		70672
Sbjct	76288	TGTAGTTTAACTGGAGGAACCGGAGTGGGTAAGACGTCACAGGTACCCAAGTTATTGCT		76347
Query	70673	TTGGTTTAATTATTTATTTGGTGGATTCTCTACTCTAGATAAAATCACTGACTTTCACGA		70732
Sbjct	76348	TTGGTTTAATTATTTATTTGGGGATTCTCTACTCTAGATAAAATCACTGACTTTCACGA		76407
Query	70733	AAGACCAGTCATTCTATCTCTCTCTAGGATAGCTTTAGTTAGATTGCATAGCAATACCAT		70792
Sbjct	76408	ACGACCAGTCATTCTATCTCTCTCTAGGATAGCTTTAGTTAGATTGCATAGCAATACTAT		76467
Query	70793	TTTAAATCATTGGGATTTAAGGTACTAGATGGATCTCCTATTTCTTTACGGTACGGATC		70852
Sbjct	76468	TTTAAATCATTGGGATTTAAGGCACTAAATGGATCTCCGATTTCTTTACGATATGGATC		76527
Query	70853	TATACCGGAAGAATTAATAAACAAACAACCaaaaaaTATGGAATTGTATTTTCTACCCA		70912

Sbjct	76528	TATACCGGACGAATTAATAAACAAACATCCAAAAAATATGGAATTGTATTTCTACCCA	76587
Query	70913	TAAGTTATCTCTAACAAAACATTTTAGTTATGGCACTCTTATTATAGACGAAGTTCATGA	70972
Sbjct	76588	TAAGTTATCTTTAACAAAACATTTTAGTTATGGCACTCTTATTATAGACGAAGTTCATGA	76647
Query	70973	GCATGATCAAAATAGGAGATATTATTATAGCAGTAGCGAGAAAGCATCATACGAAAATAGA	71032
Sbjct	76648	GCATGATCAAAATAGGAGATATCATTATAGCAGTAGCGAGAAAGCATCATACGAAAATAGA	76707
Query	71033	TTCTATGTTTTTAAATGACTGCCACGTTAGAGGATGACAGGGAACGGCTAAAAGTATTTTT	71092
Sbjct	76708	TTCTATGTTTTTAAATGACTGCCACGTTAGAGGATGACAGGGAACGCTCTAAAAGTATTTTT	76767
Query	71093	ACCTAATCCCGCATTATACATATTCTGGAGATACACTGTTTAAAATTAGCGAGGTATT	71152
Sbjct	76768	ACCCAATCCCGCATTATACATATTCTGGAGAAACACTCTTTAAAATTAGTGAGGTGTT	76827
Query	71153	TATTCATAATAAGATAAATCCATCTTCCAGAATGGCATACATAGAAGAAGAAAAGAGAAA	71212
Sbjct	76828	TATTCATAATAAGATAAATCCATCTTCCAGAATGGCATACATAGAAGAAGAAAAGAGAAA	76887
Query	71213	TTTAGTTACTGCTATACAGATGTATACTCCTCCTGATGGATCATCCGGTATAGTCTTTGT	71272
Sbjct	76888	TTTAGTCACTGCTATACAGATGTATACTCCTCCTGATGGATCATCCGGTATAGTCTTTGT	76947
Query	71273	GGCATCCGT-TGCACAGTGTACGAATATAAATCATATTTAGAAAAAGATTACCGTATG	71331
Sbjct	76948	GGCAACAGTCT-CGCAGTGTACGAATATAAATCATATTTAGAAAAGAGATTGTCGTATG	77006
Query	71332	ATATGTATATTATTCATGGTAAGGTCTTAGATATAGACGAAATATTAGAAAAAGTGATT	71391
Sbjct	77007	ATATGTATATTATTCATGGTAAGGTCTTAGATATAGACGAAATATTAGAAAAAGTGATT	77066
Query	71392	CATCACCTAATGTATCGATAATTATTTCTACTCCTTATTGGAATCCAGCGTTACTATAC	71451
Sbjct	77067	CATCACCTAACGTATCGATACTTATTTCTACTCCTTATTGGAATCTAGCGTTACTATAC	77126
Query	71452	GCAATGTTACACACATTATGATATGGGTAGAGTTTTGTCCCCGTCCTTTTGAGGAT	71511
Sbjct	77127	GCAATGTTACACACATTATGATATGGGTAGAGTTTTGTCCCCAGTCCTTTTGAGGAT	77186
Query	71512	CGCAAGAATTTATTTCTAAATCTATGAGAGATCAACGAAAAGGAAGAGTAGGAAGAGTTA	71571
Sbjct	77187	CGCAACAATTTATTTCTAAATCTATGAGAGATCAACGAAAAGGAAGAGTAGGAAGAGTTA	77246
Query	71572	ATCCTGGGACATACGTATATTTCTATGATCTGTCTTATATGAAGTCTATACAGCGAATAG	71631
Sbjct	77247	ATCCTGGAACGTACGCTCTATTTCTATGATCTGTCTGATATGAAGTCTATACAGCGAATAG	77306
Query	71632	ATTCAGAATTTCTACATAAATTATATATTGTACGCTAATAAGTTTAATCTAACACTCCCCG	71691
Sbjct	77307	ATTCAGAATTTCTACATAAATTATATATTGTACGCTAATAAATTTAATCTAACACTCCCCG	77366
Query	71692	AAGATTTGTTTATAATCCCTACAAATTTGGATATTCTATGGCGTACAAAGGAATATATAG	71751

Sbjct	77367	AAGATTGTTTATAATCCCTACAAATTTGGATATTCTGTGGCGTACAAAGGAATATATAG	77426
Query	71752	ACTCGTTCGATATTAGTACAGAAACATGGAATAAATTATTATCCAATTATTATATGAAGA	71811
Sbjct	77427	ACTCGTTCGATATTAGTACAGAAACATGGAATAAATTATTATCCAATTATTATATGAAGA	77486
Query	71812	TGATAGAGTATGCTAAACTTTATGTACTAAGTCCTATTCTCGCTGAGGAGTTGGATAACT	71871
Sbjct	77487	TGATAGAGTATGCTAAACTTTATGTACTAAGTCCTATTCTCGCTGAGGAGTTGGATAACT	77546
Query	71872	TTGAGAGGACGGGAGAATTAAGTAGTATTGTACGAGAAGCCATTTTATCTCTAAATTTAC	71931
Sbjct	77547	TTGAGAGGACAGGAGAATTAAGTAGTACTGTACGAGAAGCCATTTTCATCTCTAAATTTAC	77606
Query	71932	GAATTAAGATTTTAAATTTTAAACATAAAGATGATGATACGTATATACACTTTTGTAAAA	71991
Sbjct	77607	GAATCAAGATTTTAAATTTTAAACGTAAAGATGAGGATACGTATATACACTTTTGTAGAA	77666
Query	71992	TATTATTCGGTGTCTATAACGGAACAAACGCTACTATATATTATCATAGACCTCTAACGG	72051
Sbjct	77667	TATTATTCGGCGTCTATAATGGAACAAACGCTACTATATATTATCATAGACCTCTAACAG	77726
Query	72052	GATATATGAATATGATTTTCAGATACTATATTTGTTCTGTAGATAATAACTAA	72104
Sbjct	77727	GATATATGAATATGATTTTCAGATACTATATTTGTTCTGTAGATAATAACTAA	77779

3.2. Vacciniavirus MVA ORF G1L mit dem Homolog EVM064 des Ektromelievirus Stamm Moskau

Score = 3114 bits (1686), Expect = 0.0					
Identities = 1746/1776 (98%), Gaps = 0/1776 (0%)					
Strand=Plus/Plus					
Query	72108	TCAAACCTCTAATGACCACATCttttttttAGAGATGAAAAATTTCCACATCTCCTTTTGT	72167		
Sbjct	77782	TCAAACCTCTAATGACCACATCTTTTTTtagagatgaaaaatTTCCACATCTCCTTTTGT	77841		
Query	72168	AGACACGACTAAACATTTTGCAGAAAAAAGTTTATTAGTGTtagataATCGTATACTTC	72227		
Sbjct	77842	AGACACGACTAAACATTTTGCAGAAAAAAGTTTATTAGTGTtagataATCGTATACTTC	77901		
Query	72228	ATCAGTGTAGATAGTAAATGTGAACAGATAAAAGGTATTCTTGCTCAATAGATTGGTAAA	72287		
Sbjct	77902	ATCAGTGTAGATAGTAAATGTGAACAGATAAAAGGTATTCTTGCTCAATAGATTGGTAAA	77961		
Query	72288	TTCCATAGAATATATTAATCCTTTCTTCTTGAGATCCCACATCATTTCaaccagagacGT	72347		
Sbjct	77962	TTCCATAGAATATATTAATCCTTTCTTCTTGAGATCCCACATCATCTCaaccagagatGT	78021		
Query	72348	TTTATCCAATGATTACCTCGTACTATACCACATACAAAAGTATTGTCAGTGACGTC	72407		
Sbjct	78022	TTTATCCAATGATTACCTCGTACTATACCACATACAAAAGTATTGTCAGTTACGTC	78081		
Query	72408	GTACCTGGTATTCTACCAACAAAAATTTACTTTTAGTTCTTTAGAAAAATCTAAGGT	72467		
Sbjct	78082	GTACCTGTATTCTACCAACAAAAATTTACTTTTAGTTCTTTAGAAAAATCTAAGGT	78141		
Query	72468	AGAATCTCTATTTGCCAATATGTCATCTATGGAATTACCACTAGCAAAAAATGATAGAAA	72527		
Sbjct	78142	AGAATCTCTATTTGTCAATATATCATCTATGGAATTGCCACTAGCAAAAAATGATAGAAA	78201		
Query	72528	TATATATTGATACATCGCAGCTGGTTTTGATCTACTATACTTTAAAAACGAATCAGATTC	72587		
Sbjct	78202	TATATATTGATACATCGCAGCTGGTTTTGATCTACTATACTTTAAAAACGAATCAGATTC	78261		
Query	72588	CATAATTGCCTGTATATCATCAGCTGAAAAACTATGTTTACACGTATTCCTTCGGCATT	72647		
Sbjct	78262	CATAATTGCCTGTATATCATCCGTGAAAAACTATGTTTACACGTATTCCTTCGGCATT	78321		
Query	72648	TCTTTTAAATGATATATCTTGTTTAGACAATGATAAAGTTATCATGTCCATGAGAGACGC	72707		
Sbjct	78322	TCTTTTAAATGATATATCTTGTTTAGACAATGATAAAGTTATAATGTCCATGAGAGACGC	78381		
Query	72708	GTCTCCGTATCGTATAAAATATTTcattagatGTTAGACGCTTCATTAGGGGTATACTTCT	72767		
Sbjct	78382	GTCTCCGTATCGTATAAAATATTTcattagatGTTAGACGCTTCATTAGGGGTATACTTCT	78441		
Query	72768	ATAAGGTTTCTTAATCAGTCCATCATTGGTTGCGTCAAGAACTACTATCGGATGTTGTTG	72827		
Sbjct	78442	ATAAGGTTTCTTAATTAGTCCATCATTGTTGCGTCAAGAACTACTATCGGATGTTGTTG	78501		
Query	72828	GGTATCTCTAGTGTTACACATGGCCTTACTAAAGTTTGGGTAAATAACTATGATATCTCT	72887		
Sbjct	78502	GGTATCTCTAGTGTTACACATGGCCTTACTAAAGTTTGGGTAAATAACTATGATATCTCT	78561		
Query	72888	ATTAATTATAGATGCATATATTTcattCGTCAAGGATATTAGTATCGACTTGCTATCGTC	72947		

4. Vergleich der Aminosäurenabfolge der Vaccinia MVA Proteine mit den Homologen des Ektromelievirus Stamm Moskau

4.1. Aminosäurevergleich des Vacciniavirus MVA Protein I8R mit dem Ektromelie Stamm Moskau Protein EVM063

Score = 1347 bits (3486), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 651/676 (96%), Positives = 667/676 (99%), Gaps = 0/676 (0%)			
Query	1	MEKNLPDIFFFPNCNVNFSYKYSQDEFNSMSKTERDSFSLAVFPVIKRWNAHVVKHKG	60
Sbjct	1	MEKNLPDIFFFPNCNVNFSYKYSQDEFNSMSKTER+SFSLAVFPVIKRWNAHVVKHKG	60
Query	61	IYKVSTEARGKKVSPPSLGKPAHINLTAKQYIYSEHTISFECYSFLKCITNTEINSFDEY	120
Sbjct	61	IYKVS+EARG+KVSPPSLGKP +INLT +QYIYSE+TISFECYSFLKCITNTEINSFDEY	120
Query	121	ILRGLLEAGNSLQIFSNSVGKRTDTIGVLGNKYPFSKIPLASLTPKAQREIFSAWISHRP	180
Sbjct	121	ILRGLLEAGN LQIFSNSVGKRTDTIGVLGNKYPFSKIPLASLTPKAQREIFSAWISHRP	180
Query	181	VVLTGGTGVGKTSQVPKLLWFNLYFGGFSTLTKITDFHERPVILSLPRIALVRLHSNTI	240
Sbjct	181	VVLTGGTGVGKTSQVPKLLWFNLYFGGFSTLTKITDFHERPVILSLPRIALVRLHSNTI	240
Query	241	LKSLGFKVLDGSPISLRYSIPEELINKQPKKYGIVFSTHKLSTKLFSYGTLLIIDEVHE	300
Sbjct	241	LKSLGFK L+GSPISLRYSIP+ELINK PKKYGIVFSTHKLSTKLFSYGTLLIIDEVHE	300
Query	301	HDQIGDIIIIVARKHHTKIDSMFLMTATLEDDRERLKVFLPNPAFIHIPGDTLTKISEVF	360
Sbjct	301	HDQIGDIIIIVARKHHTKIDSMFLMTATLEDDRERLKVFLPNPAFIHIPGDTLTKISEVF	360
Query	361	IHNKINPSSRMAYIEEEKRNLVTAIQMYTPPDGSSGIVFVASVAQCHEYKSYLEKRLPYD	420
Sbjct	361	IHNKINPSSRMAYIEEEKRNLVTAIQMYTPPDGSSGIVFVA+V+QCHEYKSYLEKRL YD	420
Query	421	MYIIHGKVLDDIDEILEKVYSSPNVSIISTPYLESSVTIRNVTHIYDMGRVFPAPFGGS	480
Sbjct	421	MYIIHGKVLDDIDEILEKVYSSPNVSIISTPYLESSVTIRNVTHIYDMGRVFPAPFGGS	480
Query	481	QEFISKSMRDQRKGRVGRVNPPTYVYFYDLSYMKSIQRIDSEFLHNYILYANKFNLTLP	540
Sbjct	481	QQFISKSMRDQRKGRVGRVNPPTYVYFYDLSYMKSIQRIDSEFLHNYILYANKFNLTLP	540
Query	541	DLFIIPTNLDILWRTKEYIDSFDISTETWNKLLSNYYMKMIEYAKLYVLSPIAEELDNF	600
Sbjct	541	DLFIIPTNLDILWRTKEYIDSFDISTETWNKLLSNYYMKMIEYAKLYVLSPIAEELDNF	600
Query	601	ERTGELTSIVQEAILSLNLRILNFKKHDDDTYIHFCILFGVYNGTNATIYYHRPLTG	660
Sbjct	601	ERTGELTS V+EAI SLNLRILNFK KD+DTYIHFC+ILFGVYNGTNATIYYHRPLTG	660
Query	661	YNMISDTIFVPVDNN	676
Sbjct	661	YNMISDTIFVPVDNN	676

4.2. Aminosäurevergleich des Vacciniavirus MVA Protein G1L mit dem Ektromelievirus Stamm Moskau Protein EVM064

Score = 1195 bits (3092), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust. Identities = 585/591 (99%), Positives = 588/591 (99%), Gaps = 0/591 (0%)				
Query	1	MIVLPNKVRIFINDRMKKDIYLGISNFGFENDIDEILGIAHLLLEHLLISFDSTNFLANAS	60	
Sbjct	1	MIVLPNKVRIFINDRMKKDIYLGISNFGFENDIDEILGIAHLLLEHLLISFDSTNFLANAS	60	
Query	61	TSRSYMSFWCKSINSATESDAIRTLVSWFFSNGKLKDNFSLSSIRFHIKELENEYFYRNE	120	
Sbjct	61	TSRSYMSFWCKSINSATESDAIRTLVSWFFSNGKLKDNFSLSSIRFHIKELENEYFYRNE	120	
Query	121	VFHCDILTFLSGGDLYNGGRIDMIDNLNIVRDMLVNRMQRISGSNIVIFVKRLGPGTLD	180	
Sbjct	121	VFHCDILTFLSGGDLYNGGRIDMIDNLNIVRDMLVNRMQRISGSNIVIFVKRLGPGTLD	180	
Query	181	FFKQTFGSLPACPEIIPSSIPVSTNGKIVMTPSPFYTMVKINPTLDNILGILYLYEYH	240	
Sbjct	181	FFKQTFGSLPACPEIIPSSIPVSTNGKIVMTPSPFYTMV+INPTLDNILGILYLYE+YH	240	
Query	241	LIDYETIGNQLYLTVSFIDEYTESFLRGEAILQISQCQRINMNYSDDYMMNIYLNFPWL	300	
Sbjct	241	LIDYETIGNQLYLTVSFIDEYTESFLRGEAILQISQCQ INMNYSDDYMMNIYLNFPWL	300	
Query	301	SHDLYDYITRINDDSKSILISLTNEIYASIIINRDIIVIYPNFSKAMCNTRDTQQHPVV	360	
Sbjct	301	SHDLYDYITRINDDSKSILISLTNEIY SIINRDIIVIYPNFSKAMCNTRDTQQHPVV	360	
Query	361	DATNDGLIKKPYRSIPLMKRLTSNEIFIRYGDASLMDMITLSLSKQDISLKRNAEGIRVK	420	
Sbjct	361	DATNDGLIKKPYRSIPLMKRLTSNEIFIRYGDASLMD+ITLSLSKQDISLKRNAEGIRVK	420	
Query	421	HSFSADDIQAIMESDSFLKYRSRSPAAMYQYIFLSFFASGNSIDDILANRDSTLEFSKRT	480	
Sbjct	421	HSFSADDIQAIMESDSFLKYRSRSPAAMYQYIFLSFFASGNSIDDIL NRDSTLEFSKRT	480	
Query	481	KSKILFGRNTRYDVTAKSSFVCGIVRGKSLDKTSLVEMMWDLKKKGLIYSMEFTNLLSKN	540	
Sbjct	481	KSKILFGRNTRYDVTAKSSFVCGIVRGKSLDKTSLVEMMWDLKKKGLIYSMEFTNLLSKN	540	
Query	541	TFYLFTEFTIYTDEVYDYLNTNKLFSKCLVSTKGDVENFSSLKDDVVIRV	591	
Sbjct	541	TFYLFTEFTIYTDEVYDYLNTNKLFSKCLVSTKGDVENFSSLKDDVVIRV	591	

X. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, die fachliche Unterstützung und seine konstruktive Diskussionsbereitschaft.

Frau Astrid Freudenstein, Frau Bärbel Köttgen und Frau Sylvia Fichte möchte ich auf diesem Weg herzlich für die nette Arbeitsatmosphäre und die guten Ratschläge danken. Vielen Dank auch allen anderen Kollegen im Institut für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Phil Price für die Hilfe bei den FACS-Analysen.

Dr. Regina Freyberger für die Unterstützung bei der endgültigen Fertigstellung.